

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Versuche zum Schnellnachweis von
Chlordiazepoxid, Oxazepam und
Dikaliumchlorazepat
im menschlichen Serum
bei akuten Vergiftungen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Alfred Karl-Heinz Stelzer
aus Grumbach

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Versuche zum Schnelldachweis von
Chlordiazepoxid, Oxazepam und
Dikaliumchlorazepat
im menschlichen Serum
bei akuten Vergiftungen



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Alfred Karl-Heinz Stelzer
aus Grumbach

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 1977

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
(A) <u>Einleitung</u>	4
(B) <u>Die 1,4 Benzodiazepine</u>	6
1. Chlordiazepoxid	6
2. Oxazepam	6
3. Dikaliumchlorazepat	7
4. Stoffwechsel	7
5. Nachweismethoden	13
(C) <u>Methode zur quantitativen Bestimmung von</u> <u>Chlordiazepoxid im Serum nach FRINGS und</u> <u>COHEN</u>	14
1. Prinzip	14
2. Reagentien	14
3. Arbeitsgang	16
(D) <u>Problemstellung</u>	17
(E) <u>Eigene Versuche</u>	19
I) <u>Versuche zur Festlegung der optimalen Meß-</u> <u>zeit bei der quantitativen Bestimmung von</u> <u>Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlor-</u> <u>azepat in wässriger Lösung</u>	19
1. Geräte	19
2. Reagentien	20
3. Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes für Chlordiazepoxid in wässriger Lösung	21
4. Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes für Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung	28
5. Diskussion der Ergebnisse	34

	<u>Seite</u>
II) <u>Versuche zur Herabsetzung der Schüttelzeiten bei der quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung</u>	35
1. Extinktionswerte für Chlordiazepoxid mit herabgesetzter Schüttelzeit	35
2. Extinktionswerte für Oxazepam mit herabgesetzter Schüttelzeit	40
3. Extinktionswerte für Dikaliumchlorazepat mit herabgesetzter Schüttelzeit	41
III) <u>Ergebnisse der Versuche zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum</u>	45
1. Arbeitsbedingungen	45
2. Bestimmung des Leerwertes für Serum	45
3. Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum mit 2x10 Minuten Schütteldauer	47
4. Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum mit reduzierter Schüttelzeit	57
IV) <u>Versuche zur Erfassung eines Verlustes von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Extraktion und Hydrolyse</u>	70
1. Extinktionswerte für 2-Amino-5-chlorbenzophenon bei direkter Farbreaktion	70
2. Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat, ermittelt ohne Chloroformextraktion	73

	Seite
3. Berechnung der äquivalenten Konzentrationen von 2-Amino-5-chlorbenzophenon, Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat	77
4. Berechnung der Verluste durch Hydrolyse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat	79
5. Berechnung der Verluste durch Extraktion und Hydrolyse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung	83
6. Berechnung der Verluste durch Extraktion und Hydrolyse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum	88
(F) <u>Diskussion</u>	94
(G) <u>Zusammenfassung</u>	98
(H) <u>Literaturverzeichnis</u>	99

(A) Einleitung

Drogenabusus bei Sucht oder bei Suicidversuch kann zu leichten bis schweren Vergiftungen führen. Da oft die eingenommenen Drogen nicht bekannt sind, wird eine gezielte Hilfe umso eher erfolgreich sein können, wenn chemische Untersuchungsmethoden in kurzer Zeit zur Erkennung der Droge und der Feststellung ihrer Menge führen.

In der ärztlichen Praxis finden Substanzen mit psychotroper Wirkung immer größere Anwendung. Damit erhöht sich die Gefahr des Mißbrauchs. Tödliche Vergiftungen allein durch 1,4-Benzodiazepine sind bisher kaum bekannt geworden. Überlebte Suicidversuche haben BÄUMLER und RIPPSTEIN 1961 beschrieben. Eine wesentliche Rolle spielen 1,4-Benzodiazepine bei kombinierten Vergiftungen z.B. mit Sedativa.

1,4-Benzodiazepine können im Blut, im Harn, in den Faeces und im Gewebe nachgewiesen werden. Eine Reihe von Nachweismethoden sind bereits entwickelt worden. Entscheidend bei Vergiftungen jedoch ist, daß ein Nachweisverfahren sowohl einfach und schnell durchgeführt werden kann als auch präzise und spezifische Daten liefert. Ferner sollten die technischen Voraussetzungen für die Durchführung der quantitativen Methode möglichst in jedem Krankenhauslaboratorium anzutreffen sein.

FRINGS und COHEN beschrieben 1971 eine schnelle, genaue und empfindliche photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im menschlichen Serum. GERMANO führte Untersuchungen sowohl in vitro als auch in vivo durch. Die in vitro erhaltenen Extinktionsergebnisse lagen geringfügig unter den entsprechenden von FRINGS und COHEN angegebenen Werten. Mit Hilfe einer Untersuchungsreihe an Probanden führte GERMANO Blutspiegelbestimmungen des Chlordiazepoxids bei unterschiedlicher oraler Librium-Aufnahme durch. Er gibt an, daß die gefundenen Werte sich als reproduzierbar erwiesen und mit entsprechenden Angaben aus

der Literatur übereinstimmten.

Übereinstimmung mit den Angaben von FRINGS und COHEN zeigte sich auch im zeitlichen und technischen Aufwand zur Chlordiazepoxid-Bestimmung im Serum, der als gering gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren bezeichnet wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, in einer Untersuchungsreihe zu prüfen, ob die Schnellmethode neben Chlordiazepoxid auch für die Tranquillantien Oxazepam und Dikaliumchlorazepat anwendbar und durch Reduzierung der Schüttelzeit eventuell eine Verringerung des zeitlichen Aufwandes zu erreichen ist.

(B) 1,4 Benzodiazepine (Chlordiazepoxyd-Gruppe)

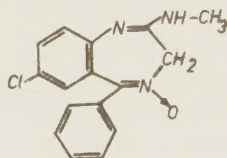
In die Gruppe der Benzodiazepine gehören unter anderem auch einige Tranquilizer. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessieren besonders Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

1. Chlordiazepoxid

(Librium^R, 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid)

Summenformel: $C_{16}H_{14}ClN_3O$

Strukturformel:

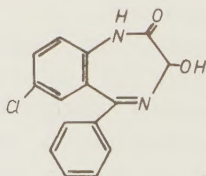


2. Oxazepam

(Adumbran^R, 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on)

Summenformel: $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$

Strukturformel:

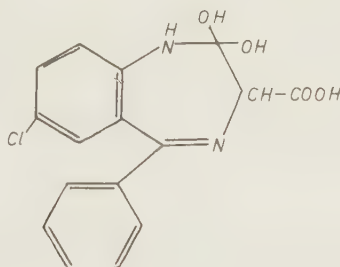


3. Dikaliumchlorazepat

(Tranxilium^R, Dikalium-7-chlor-3-carboxy-1,3-dihydro-2,2-dihydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin)

Summenformel: $C_{16}H_{13}ClN_2O_4$

Strukturformel:



4. Stoffwechsel

Der Stoffwechsel der einzelnen Verbindungen der Chlordiazepoxid-Gruppe ist eingehend untersucht. Er zeigt sich auch beim Menschen eng miteinander verflochten. Dabei entstehen zahlreiche ähnliche, nur geringfügig veränderte, oft identische Metaboliten. Zum Teil handelt es sich sogar um einen anderen Wirkstoff der Gruppe (Abb. 1).

Durch ausführliche Studien konnte nachgewiesen werden, daß der Chlordiazepoxid-Stoffwechsel sehr langsam abläuft und dadurch auch eine verzögerte Ausscheidung bedingt. SMYTH und PENNINGTON (1963) fanden in einzelnen Plasmaproben nach 72 Stunden nach Chlordiazepoxid-Einnahme und sogar 7 Tage später noch kleine Chlordiazepoxidemengen. Sie vermuteten eine Speicherung im Gewebe und eine nachfolgende Abgabe ins Blut. Die Autoren geben an, daß nur 0,8 % der aufgenommenen Dosis durch den Harn ausgeschieden wird und die maximale Ausscheidung erst nach 24-30 Stunden stattfinden soll.

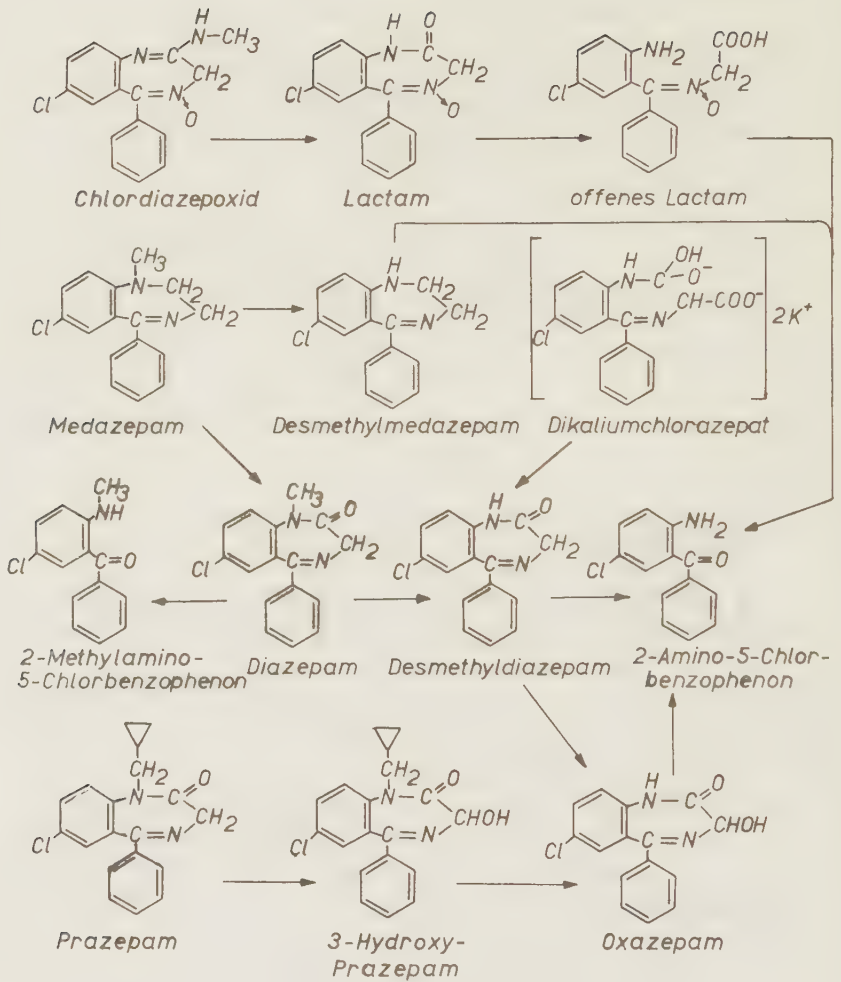


Abb. 1

Stoffwechselschema der Benzodiazepine

Die unveränderten Wirkstoffe werden nur in geringer Menge im Urin ausgeschieden; der größte Teil verläßt den Körper durch den Harn und die Faeces in Form von Metaboliten (KÖCHLIN und SCHWARTZ, 1961; PRIBILLA, 1964; KÖCHLIN und Mitarb. 1965). Nach BÄUMLER und RIPPSTEIN liegt ein Teil der Abbauprodukte in Form ihrer Glucuronide vor.

Ein wichtiger Schritt im Stoffwechselgeschehen des Chlordiazepoxids ist die Überführung in das "Lactam". Nach KÖCHLIN und D'ARCONTE (1963) geschieht dies durch milde saure hydrolytische Spaltung der Methylamino-Gruppe bei C₂. Diesem Schritt soll nach SCHWARTZ und POSTMA (1966) eine Desmethylierung bei C₂ vorausgehen.

Das Lactam wird als Metabolit nur zum Teil ausgeschieden, da es teilweise unter Ringöffnung bei C₂ zu einer Aminosäure, dem "offenen Lactam" weiter gespalten wird. Das "offene Lactam" seinerseits wird zum Teil als Metabolit im Urin ausgeschieden, zum Teil in eine labile unbekannte Alkali-Verbindung überführt (KÖCHLIN und Mitarb. 1965).

Ein weiteres Spaltprodukt des Chlordiazepoxids ist das 2-Amino-5-chlorbenzophenon. Dieses läßt sich durch eine noch stärkere saure hydrolytische Spaltung mit 3n HCl erzeugen (STERNBACH und REEDER, 1961).

Das gleiche Spaltprodukt wie bei der Hydrolyse von Chlordiazepoxid bildet sich bei der Hydrolyse von Oxazepam mit 2n HCl in der Wärme. Der Benzodiazepinring wird aufgespalten und es entsteht das 2-Amino-5-chlorbenzophenon (KAMM und KELM, 1969).

Der unveränderte Wirkstoff Oxazepam konnte im Harn nach oraler Applikation höchstens in Spuren nachgewiesen werden; als Oxazepam-Glucuronid betrug die im Harn ausgeschiedene Menge jedoch mindestens 90 % (PELZER und MAAß, 1969).

Dikaliumchlorazepat nimmt unter den therapeutisch verwendeten Benzodiazepinen hinsichtlich seines Metabolismus eine Sonderstellung ein. Bei oraler Verabreichung wird die Substanz im

Verlauf der Magenpassage sehr schnell hydrolysiert und praktisch quantitativ in Desmethyldiazepam umgewandelt (Curry, 1974). Im weiteren Verlauf der Metabolisierung erfolgt die langsamere Umwandlung in Oxazepam und anschließende Glucuronisierung und Ausscheidung der Glucuronsäurederivate.

Die langsame Ausscheidung von etwa 80 % der verabreichten Menge innerhalb der ersten zehn Tage über die Niere weist auf die erhöhte Serumbindung des nächsten, ebenfalls wirksamen Metaboliten Oxazepam hin, die nach MÜLLER und WOLLERT (1973) auf die polare Substitution am C₃-Ringatom durch die OH-Gruppe zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf liegt die Ausscheidungsrate bei etwa 1 % täglich.

Hydrolysiert man Dikaliumchlorazepat mit einer 3n Salzsäure, entsteht als Spaltprodukt wie bei Chlordiazepoxid und Oxazepam das 2-Amino-5-chlorbenzophenon.

Eine Unterscheidung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat ist nach der Hydrolyse somit nicht mehr möglich.

Über Blutspiegelwerte des Chlordiazepoxids, Oxazepams und Dikaliumchlorazepats liegen die Angaben verschiedener Autoren vor.

Chlordiazepoxid und Oxazepam wurden als 2-Amino-5-chlorbenzophenon bestimmt, während Dikaliumchlorazepat als Desmethyldiazepam nachgewiesen wurde (Tab. 1-3).

Vergleicht man die Werte der einzelnen Autoren, so findet sich ein Gipfel des Chlordiazepoxidspiegels bei 2 Stunden nach der oralen Aufnahme und weitgehende Übereinstimmung zwischen aufgenommener Dosis und Serumspiegelwerten. GERMANOS Serumspiegelwerte verdienen dabei besondere Beachtung, da sie in systematischen Versuchen von jeweils 10 Probanden gewonnen wurden.

Tabelle 1

Maximale Chlordiazepoxid-Konzentration im Serum nach verschiedenen Autoren (bestimmt als 2-Amino-5-chlorbenzophenon).

Autoren	Zahl d. Proband.	Aufgenom. Dosis	Zeit nach Aufnahme	Serumspiegel
KOECHLIN u. D'ARCONTE	3	30 mg	2-4 h	0,13-0,20 mg /100 ml
SMYTH und PENNINGTON	9	100 mg	3 h	0,17-0,50 mg /100 ml
KOECHLIN u. Mitarb.	1	15,1 mg ⁺	1-2 h	1. 0,11 mg%
	1	14,7 mg ⁺	8 h	2. 0,08 mg%
SCHWARTZ u. Mitarb.	6	20 mg	2-4 h	0,10 mg%
BESSERER u. Mitarb.	1	30 mg	2 h	1. 0,15 mg%
	1	50 mg	1 h	2. 0,25 mg%
	1	100 mg	2 h	3. über 0,50 mg%
FRINGS und COHEN	?	25 mg	1 h	0,7 mg% ⁺⁺
GERMANO	10	20 mg	2 h	0,126 mg%
	10	30 mg	2 h	0,168 mg%
	10	40 mg	2 h	0,252 mg%

⁺ Radioaktiv-markiertes Chlordiazepoxid (¹⁴C).

⁺⁺ Zu hoher Serumspiegel! Wahrscheinlich 0,07 mg%.

Tabelle 2

Maximale Oxazepam-Konzentration im Serum nach verschiedenen Autoren (bestimmt als 2-Amino-5-chlorbenzophenon).

Autoren	Zahl der Proband.	Aufgenom. Dosis	Zeit nach Aufnahme	Serumspiegel
PELZER u. MAAß	3	20 mg	1-2 h	22-36 µg /100 ml
KAMM und KELM	5	30 mg	1-2 h	45-75 µg /100 ml

Die maximale Oxazepam-Konzentration im Serum wird trotz unterschiedlicher Dosierung von den genannten Autoren zwischen 1-2 Stunden nach oraler Gabe ermittelt. Vergleichende Serumspiegelwerte verschiedener Autoren von äquivalenten Mengen Oxazepam lagen nicht vor.

Tabelle 3

Maximale Dikaliumchlorazepat-Konzentration im Serum (bestimmt als Desmethyldiazepam).

Autoren	Zahl der Proband.	Aufgenom. Dosis	Zeit nach Aufnahme	Serumspiegel
CUMMINS u. SCHERFLING	5	15 mg	1 h	23 µg/100 ml

Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Werte sind den Versuchen an 5 Probanden entnommen, deren Desmethyl-Serumspiegel über 48 Stunden nach einmaliger Gabe von 15 mg Dikaliumchlorazepat nach dem Verfahren von DE SILVA in bestimmten Zeitabständen gemessen wurde.

Bereits innerhalb 1 Stunde kommt es zu einem steilen Anstieg des Desmethyl-Serumspiegels. Die Erklärung hierfür

liegt nach Angaben der Autoren in dem für Dikaliumchlorazepat schnellen Ablauf des ersten Metabolisierungsschrittes.

5. Nachweismethoden

Seit BÄUMLER und RIPPSTEIN 1961 erstmals mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie den Nachweis von Chlordiazepoxid im Blut und im Harn erbracht haben, hat es in den folgenden Jahren an den unterschiedlichsten Nachweismethoden nicht gefehlt.

Eine colorimetrische Methode (RANDALL, 1961), die Spektrofluorometrie (KÖCHLEIN und D'ARCONTE, 1963), die Mikrokristallographie (SMYTH und PENNINGTON, 1963), die Chromatographie und die Spektrophotometrie (SMYTH und PENNINGTON, 1963), die Gas-Chromatographie (KAZYAK und KNOBLOCK, 1963), die ^{14}C -Methode (KÖCHLIN und Mitarbeiter, 1965), die Reextraktionsmethode (BESSERER und Mitarbeiter, 1971) und eine UV-spektrophotometrische Methode (JALTOW, 1972) wurden zum Nachweis von Chlordiazepoxid eingesetzt.

Vielen Verfahren haftet jedoch entweder Umständlichkeit, Ungenauigkeit oder Langwierigkeit an.

FRINGS und COHEN beschrieben erstmals 1971 eine Modifikation der von RANDALL angegebenen colorimetrischen Methode zur Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum.

In diesem Verfahren wird zur Extraktion Chloroform anstelle von Äther benutzt und dadurch eine höhere Chlordiazepoxid-Ausbeute erreicht. FRINGS und COHEN heben die Schnelligkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit ihres Verfahrens hervor.

(C) Methode zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum nach FRINGS und COHEN

1. Prinzip

Die Methode beruht auf der Extraktion von Chlordiazepoxid aus dem Serum mit Hilfe von Chloroform sowie auf der hydrolytischen Spaltung des Wirkstoffes zu einem aromatischen Amin. Dieses wird zuerst diazotiert und dann unter Zusatz von Ammonium-Sulfamidat und Kupplungsreagens in einen violetten Azo-Farbstoff umgewandelt, dessen Extinktion bei 550 nm photometrisch bestimmt werden kann.

2. Reagentien

a) Phosphatpuffer, pH 7,4

Zur Herstellung dieses Puffers werden 71 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) in etwa 800 ml aqua dest. gelöst. Anschließend bringe man die Lösung durch Zusatz von verdünnter HCl unter Kontrolle eines pH-Meters auf den gewünschten pH-Wert von 7,4. Nach Verdünnung auf 1 Liter kann die Lösung in einer braunen Glasflasche bei Zimmertemperatur bis zu 6 Monaten aufbewahrt werden.

b) 6n HCl

Gleiche Volumina konzentrierter HCl und aqua dest. werden gemischt.

c) Natrium-Nitrit-Lösung, 0,1 %

100 mg Natrium-Nitrit (NaNO_2) werden in 100 ml aqua dest. gelöst und in einer braunen Glasflasche bei 4-6° C aufbewahrt. Stabilität etwa 2 Wochen.

d) Ammonium-Sulfamidat-Lösung, 0,5 %

500 mg Ammonium-Sulfamidat werden in 100 ml aqua dest. gelöst und in einer braunen Glasflasche bei 4-6° C aufbewahrt. Stabilität etwa 3 Monate.

e) Kupplungsreagens

50 mg N-(1-Naphthyl)-äthylen-diammonium-dichlorid werden in 100 ml aqua dest. gelöst und in einer braunen Glasflasche bei 4-6° C aufbewahrt. Stabilität etwa 3 Monate.

f) Chlordiazepoxid-Stammlösung

100 mg Chlordiazepoxid-Reinsubstanz ⁺⁾ wird in 100 ml aqua dest. gelöst und in einer braunen Glasflasche bei 4-6° C aufbewahrt. Stabilität etwa 1 Monat.

⁺⁾ Chlordiazepoxid-Reinsubstanz wurde freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

3. Arbeitsgang

- a) In einen 50 ml Erlenmeyer-Kolben mit Glasstopfen
entweder 2 ml H_2O zur Herstellung eines Nullwertes
oder 2 ml eines der Arbeitsstandards
oder 2 ml aus dem jeweils zu untersuchenden
Serum pipetieren
sowie 4 ml Phosphatpuffer
und 15 ml Chloroform zugeben.
10 Minuten schütteln, dann zentrifugieren.
-

- b) nimm 10 ml der Chloroformschicht (nach Absaugen
der oberen Schicht) und gebe sie in
einen 50 ml Erlenmeyer-Kolben.
gib 3 ml 6n HCl hinzu.
10 Minuten schütteln, dann zentrifugieren.
-

- c) nimm 2 ml aus der oberen sauren wässrigen
Phase und erhitze in einem Reagenz-
glas 20 Minuten im kochenden Wasser-
bad. Danach auf Zimmertemperatur ab-
kühlen.
-

- d) gib 2 ml H_2O
und 0,5 ml $NaNO_2$ 0,1 % hinzu, mische.
5 Minuten stehen lassen.
-

- e) gib 0,5 ml Ammonium-Sulfamidat 0,5 % hinzu,
mische.
gib 1,0 ml Kupplungsreagens hinzu, mische.
15 Minuten stehen lassen
-

- f) Photometrische Messung bei 550 nm. Die Farbe ist
10 Minuten lang stabil.
-

(D) Problemstellung

FRINGS und COHEN beschrieben 1971 eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im menschlichen Serum. GERMANO ermittelte 1974 nach gleicher Methode die Blutspiegelwerte von Probanden nach unterschiedlicher oraler Gabe von Chlordiazepoxid.

GERMANO führte 1974 nach gleicher Methode Untersuchungen sowohl in vitro als auch in vivo durch. Die in vitro erhaltenen Extinktionsergebnisse lagen unter den entsprechenden Werten von FRINGS und COHEN. Er gibt an, daß Chlordiazepoxid, das dem Serum zugesetzt worden war, zu 97,5 % wiedergewonnen werden konnte und damit nahezu das Ergebnis von FRINGS und COHEN erreicht wurde.

Diese Wiederfindungsrate ist jedoch relativ, da GERMANO die gemessenen Extinktionswerte verschiedener Konzentration aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung (100 mg Chlordiazepoxid-Reinsubstanz auf 100 ml aqua dest.) mit 100 % bezeichnete. Eventuelle Verluste durch Extraktion und Hydrolyse bleiben somit unberücksichtigt.

Die von FRINGS und COHEN sowie GERMANO erzielten Ergebnisse gilt es daraufhin noch einmal zu beleuchten. Darüber hinaus ist das Ziel dieser Arbeit:

- a) in einer Untersuchungsreihe die von FRINGS und COHEN sowie GERMANO beschriebene photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum auf ihre Schnelligkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit hin zu überprüfen,
- b) zu prüfen, ob die beschriebene Methode für die Tranquillantien Oxazepam und Dikaliumchlorazepat anwendbar ist,
- c) durch Reduzierung der Schüttelzeit das Verfahren für alle 3 Tranquillantien zu beschleunigen,
- d) den Verlust von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Extraktion und Hydrolyse zu erfassen.

Alle Versuche verlaufen dabei nach dem gleichen Prinzip. Das nachzuweisende Benzodiazepin wird zuerst mit Chloroform extrahiert, dann hydrolysiert und anschließend colorimetrisch quantitativ als 2-Amino-5-chlorbenzophenon bestimmt.

(E) Eigene Versuche

I) Versuche zur Festlegung der optimalen Meßzeit bei der quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung.

1. Geräte

Alle zur Durchführung der Versuche erforderlichen Extinktionsmessungen wurden mit einem SHIMADZU DOUBLE BEAM SPEKTROPHOTOMETER UV-200 der Firma Shimadzu Seisakusho LTD. Scientific Instrument Plant, Scientific & Industrial Instrument Division, KYOTO, Japan, vorgenommen.

Als Extinktionsmaximum des 2-Amino-5-chlorbenzophenon wird 550 nm angegeben. Die Extinktionsmessungen erfolgten deshalb über einen Wellenlängenbereich von 700 nm bis 500 nm, wobei Küvetten von 10 mm Schichtlänge verwendet wurden.

Zum Schütteln des Gemisches verwendet man am besten 50 ml-Erlenmeyer-Kolben mit eingeschliffenen Glasstopfen.

Es spielt zur Erzielung des Ergebnisses keine Rolle, ob das Gemisch mit einem elektrischen Schüttelapparat oder manuell geschüttelt wird.

In der hier vorliegenden Versuchsreihe wurde bei Schüttelzeiten von 2x10 Minuten bis 2x3 Minuten maschinell geschüttelt. Bei darunterliegenden Schüttelzeiten erweist sich die manuelle Schüttelung bei nicht mehr als 4 Bestimmungen als schneller und weniger aufwendig.

Zum Zentrifugieren wurden 15 ml Zentrifugengläser verwendet.

Die Trennung der Phasen (siehe Arbeitsgang 3.b) erfolgte durch Absaugen der oberen Schicht mittels einer Wasserstrahlpumpe.

2. Reagentien

- a) Es werden die Reagentien auf Seite 14 und 15 benötigt sowie außerdem
- b) 2-Amino-5-chlorbenzophenon
50 mg 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Reinsubstanz werden in 50 ml Äthanol gelöst und in einer Glasflasche aufbewahrt.
- c) Oxazepam-Stammlösung
100 mg Oxazepam-Reinsubstanz⁺⁾ werden in 100 ml Äthanol gelöst und in einer braunen Glasflasche bei 4-6° C aufbewahrt. Stabilität etwa 1 Monat.
- d) Dikaliumchlorazepat-Stammlösung
100 mg Dikaliumchlorazepat-Reinsubstanz⁺⁺⁾ werden in 100 ml aqua dest. gelöst und in einer braunen Glasflasche bei 4-6° C aufbewahrt.
Stabilität etwa 1 Monat.

⁺⁾ Oxazepam-Reinsubstanz wurde freundlicherweise von der Firma Dr. Karl Thomae GmbH zur Verfügung gestellt.

⁺⁺⁾ Dikaliumchlorazepat-Reinsubstanz wurde freundlicherweise von der Firma Heinrich Mack Nachf. zur Verfügung gestellt.

3. Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes für Chlordiazepoxid in wässriger Lösung

Photometrische Messungen bei 550 nm zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid nach der Arbeitsanleitung von FRINGS und COHEN führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Die Meßwerte differierten bis zu 34 %. Alle benutzten Reagentien wiesen die von FRINGS und COHEN angegebenen Konzentrationen auf und wurden in braunen Glasflaschen bei 4-6° C (Phosphatpuffer bei Zimmertemperatur) aufbewahrt.

So wurden zunächst Versuche durchgeführt, um die optimale Zeit bis zur photometrischen Messung zu ermitteln. Aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung (100 mg Chlordiazepoxid auf 100 ml aqua dest.) wurden 4 Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% hergestellt. Von jedem Arbeitsstandard wurden 2 Bestimmungen zum Nachweis von Chlordiazepoxid durchgeführt und gegen einen Leerwert aus aqua dest. gemessen. Die erste Extinktionsmessung erfolgte 15 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens, jede weitere Messung 5 Minuten später. Es erfolgten jeweils 3 Messungen pro Bestimmung über einen Zeitraum von 55 Minuten.

Überträgt man die 18 gemessenen Extinktionswerte jeder Konzentration auf ein Diagramm, erhält man für jede Chlordiazepoxid-Konzentration 2 Extinktions-Zeit-Kurven, die Aufschluß über den optimalen Meßzeitpunkt geben.

Die Ergebnisse dieser Meßreihe sind in Tabelle 4 zusammengefaßt und durch die Abbildung 2, 3 und 4 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 4

Extinktionswerte für 4 Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% zur Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes. Die Extinktionsmessungen erfolgten alle 5 Minuten, beginnend 15 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens, über einen Zeitraum von 55 Minuten bei 550 nm.

Messung	Konzentration 0,5 mg%		Konzentration 1,0 mg%	
nach	Extinktionen		Extinktionen	
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
15'	0,033	0,041	0,070	0,079
20'	0,043	0,046	0,082	0,089
25'	0,048	0,049	0,091	0,095
30'	0,049	0,050	0,097	0,099
35'	0,049	0,050	0,099	0,100
40'	0,049	0,050	0,099	0,100
45'	0,049	0,050	0,099	0,100
50'	0,049	0,050	0,099	0,100
55'	0,049	0,050	0,099	0,100

Messung	Konzentration 2,0 mg%		Konzentration 4,0 mg%	
nach	Extinktionen		Extinktionen	
	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8
15'	0,155	0,160	0,331	0,360
20'	0,173	0,177	0,361	0,381
25'	0,185	0,188	0,382	0,394
30'	0,193	0,196	0,392	0,400
35'	0,198	0,200	0,398	0,401
40'	0,199	0,200	0,400	0,401
45'	0,199	0,200	0,401	0,402
50'	0,199	0,200	0,401	0,403
55'	0,199	0,200	0,401	0,403

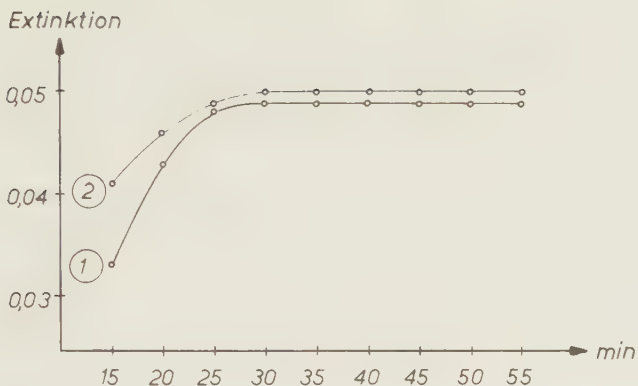


Abb. 2

Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid in wässriger Lösung in einer Konzentration von 0,5 mg%.

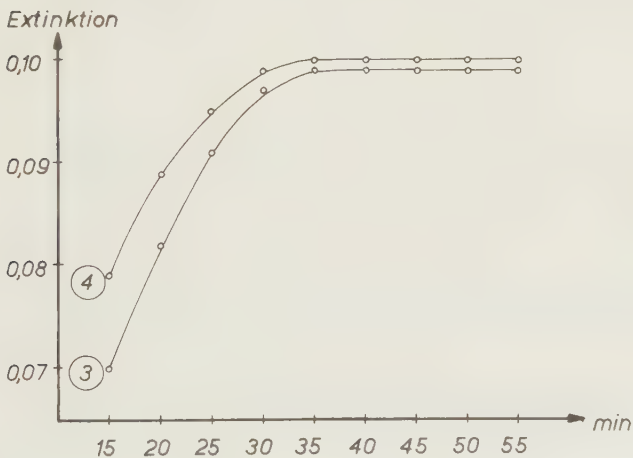


Abb. 3

Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid in wässriger Lösung in einer Konzentration von 1,0 mg%.

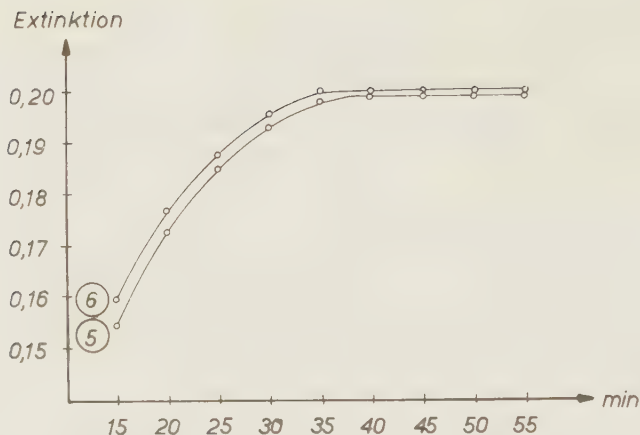


Abb. 4

Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid in wässriger Lösung in einer Konzentration von 2,0 mg%.

Aus Tabelle 4 und den Abbildungen 2 bis 5 ist ersichtlich, daß eine photometrische Messung mit reproduzierbaren Werten frühestens 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens erfolgen kann. Erst danach scheint der violette Azofarbstoff stabil zu sein. Ferner wiesen Probemessungen bei verschiedenen Konzentrationen über mindestens 2 Stunden ein gleichbleibendes Extinktionsmaximum auf. Der Farbstoff bleibt also nach 35 Min. über einen längeren Zeitraum stabil.

Im Unterschied zu diesen Ergebnissen führen FRINGS und COHEN ihre photometrischen Messungen nach 15 Minuten durch und geben eine Farbstabilität von nur 10 Minuten an.

Die Differenz im Meßzeitpunkt kann möglicherweise auch eine Erklärung dafür sein, daß die von GERMANO in vitro erhaltenen Extinktionswerte unter den entsprechenden von

Für 30 und 40 Minuten gemessenen Werten liegen. Die Zeit bis zur photometrischen Messung betrug bei LUKASZ 10 Minuten, bei FRINGS und COHEN 15 Minuten.

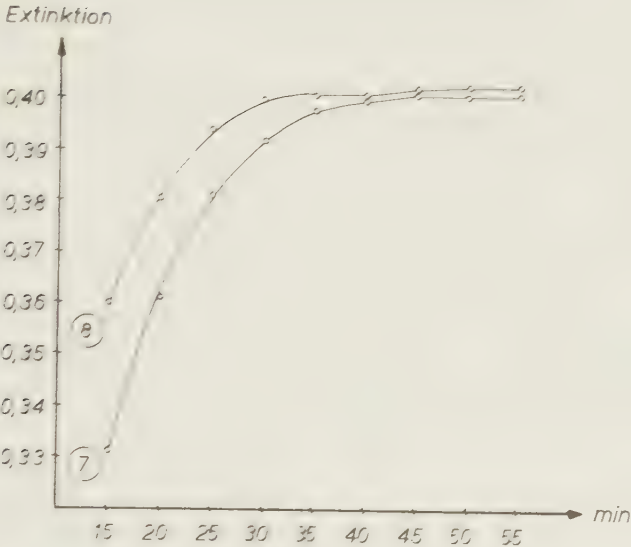


Abb. 5

Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid in wässriger Lösung in einer Konzentration von 4,0 µg%.

Mit dem für Chlordiazepoxid gefundenen optimalen Meßzeitpunkt wurden noch einmal pro Arbeitsstandard 3 Bestimmungen zum Nachweis von Chlordiazepoxid durchgeführt und gegen einen Leerwert aus aqua dest. gemessen. Aus den erhaltenen Extinktionswerten wurde für jeden Arbeitsstandard ein Mittelwert errechnet. Die Schüttelzeit betrug 2x10 Minuten.

Bei einem Extinktionsmaximum von 550 nm erfolgten die photometrischen Messungen 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens. Die Werte sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5

Extinktionswerte mit Mittelwerten für 4 Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards verschiedener Konzentration.

Konzentration	Gemessene Extinktion	Mittelwert
0,5 mg%	0,049 0,050 0,051	0,050
1,0 mg%	0,099 0,100 0,102	0,100
2,0 mg%	0,198 0,200 0,203	0,200
4,0 mg%	0,395 0,401 0,408	0,401

Eine Übertragung der errechneten Mittelwerte in ein Diagramm ergibt eine Kurve. In Abb. 6 ist diese Kurve zusammen mit der Eichkurve von FRINGS und COHEN dargestellt.

Das Diagramm zeigt, daß sich aus der Eichkurve von FRINGS und COHEN im Vergleich mit der eigenen, die doppelte Extinktion bei gleicher Konzentration ablesen läßt. Das ist bedingt durch die Verwendung von Küvetten mit 19 mm Schichtlänge bei FRINGS und COHEN. In den eigenen Versuchen wurden Küvetten mit 10 mm Schichtlänge benutzt und gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz nur die halbe Extinktion erreicht.

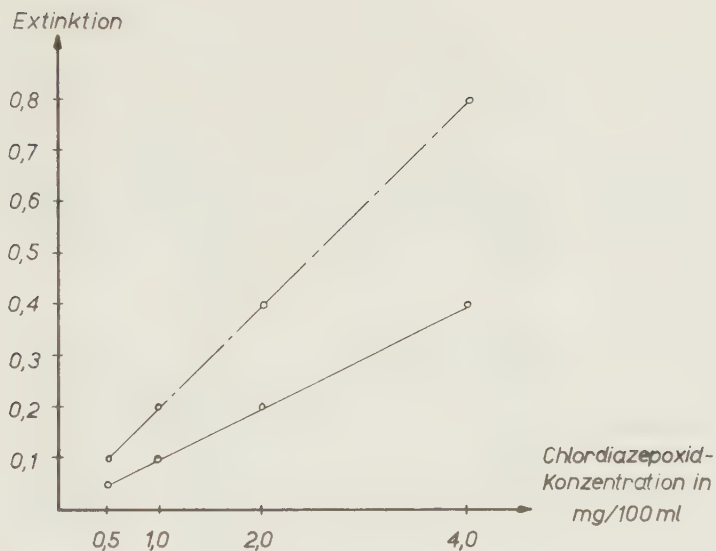


Abb. 6

Vergleich der von FRINGS und COHEN (— - —) und uns erstellten (—) Eichkurve.

Die Ergebnisse von FRINGS und COHEN wurden durch die eigenen Versuche bestätigt mit dem Unterschied, daß die photometrischen Messungen nicht 15 Minuten, sondern 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens stattfanden.

4. Prüfung eines optimalen Meßzeitpunktes für Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung

In einer Versuchsreihe zur Bestimmung von Chlordiazepoxid in wässriger Lösung wurden als optimaler Meßzeitpunkt 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens ermittelt. In den nächsten Versuchen galt es festzustellen, ob für Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN bereits nach 15 Minuten maximale Extinktionen gemessen werden können oder ob ebenso wie bei Chlordiazepoxid in wässriger Lösung die Extinktionen nach 35 Minuten maximal sind.

a) Extinktionswerte für Oxazepam

Bevor die Versuchsreihe mit Oxazepam in wässriger Lösung durchgeführt wurde, erwies sich in Probemessungen mit verschiedenen Konzentrationen, daß bis 2 mg% der optimale Meßzeitpunkt wie bei Chlordiazepoxid 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens liegt. Mit steigender Konzentration jedoch stellt sich der Meßzeitpunkt später ein. Die in Tab. 6 mit einem +) und ++) versehenen Ergebnisse wurden nach 40 bzw. 45 Minuten gemessen, da erst dann das Extinktionsmaximum für mindestens 1 Stunde gleich blieb.

Für die Hauptversuche wurden aus 5 Oxazepam-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg%, hergestellt aus einer Oxazepam-Stammlösung (100 mg Oxazepam auf 100 ml aqua dest.) je 3 Bestimmungen, die gegen einen Leerwert aus aqua dest. gemessen wurden, durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Mit einer Schüttelzeit von 2x10 Minuten erfolgten die photometrischen Messungen bei einem Extinktionsmaximum von 550 nm 15 Minuten und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Die Meßergebnisse sowohl nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN als auch in der modifizierten Form mit in eigenen Versuchen ermitteltem optimalen Meßzeitpunkt sind in der folgenden Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6

Extinktionswerte mit Mittelwerten für 5 Oxazepam-Arbeitsstandards verschiedener Konzentration.

Konzentration	Extinktion nach 15'	Mittelwert	Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,089 0,090 0,090	0,090	0,099 0,099 0,100	0,099
1,0 mg%	0,180 0,182 0,185	0,182	0,197 0,199 0,203	0,200
2,0 mg%	0,341 0,342 0,350	0,344	0,395 0,398 0,405	0,399
3,0 mg%	0,420 0,430 0,450	0,433	0,602 0,581 0,599	0,594 ⁺⁾
4,0 mg%	0,610 0,620 0,631	0,620	0,758 0,760 0,775	0,764 ⁺⁺⁾

⁺⁾ Messung erfolgte nach 40 Minuten

⁺⁺⁾ Messung erfolgte nach 45 Minuten

Überträgt man die Mittelwerte für jede Konzentration auf ein Diagramm, erhält man 2 Kurven. Die nach 15 Minuten gemessenen Werte ergeben die in Abb. 7 dargestellte Kurve A, die nach 35 Minuten gemessenen Werte Kurve B. Kurve A verläuft im Gegensatz zu Kurve B unlinear und liegt mit seinen Extinktionsmaxima darunter.

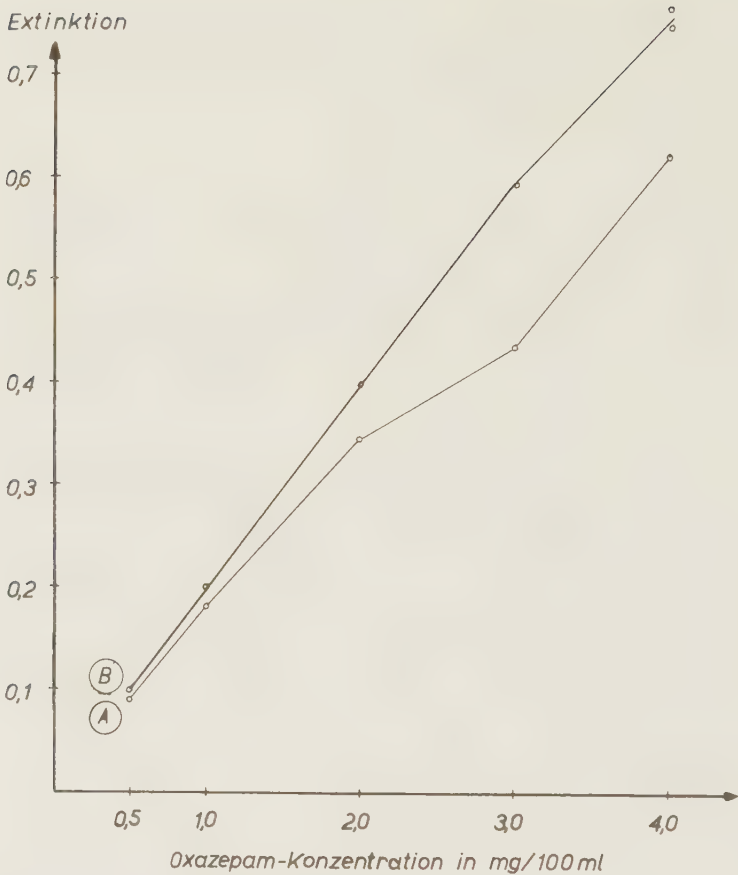


Abb. 7

Extinktionsmittelwerte verschiedener Oxazepam-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg%.

Kurve A: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 15 Minuten bei 550 nm

Kurve B: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm

Aus Tab. 6 und Abb. 7 ergibt sich, daß die Kurve B unter den beschriebenen Bedingungen - Schüttelzeit 2x10 Minuten und Extinktionsmessung nach 40 Minuten - im Bereich von 0,5 mg% bis 3,0 mg% als Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Oxazepam in wässriger Lösung dienen kann.

b) Extinktionswerte für Dikaliumchlorazepat

Bevor die Versuchsreihe mit Dikaliumchlorazepat durchgeführt wurde, zeigten Probemessungen, daß sich Dikaliumchlorazepat unter den Bedingungen von FRINGS und COHEN aus wässriger Lösung sehr schwer extrahieren läßt und erst ab etwa 2,0 mg% meßbare Werte liefert. Auch hier erwiesen sich - wie bei Chlordiazepoxid und Oxazepam - 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens als optimaler Meßzeitpunkt.

Für die Versuchsreihe wurden 4 Dikaliumchlorazepat-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 2,0 mg%, 4,0 mg%, 6,0 mg% und 8,0 mg% aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung (100 mg Dikaliumchlorazepat auf 100 ml aqua dest.) hergestellt. Pro Arbeitsstandard wurden 3 Bestimmungen durchgeführt, die gegen einen Leerwert aus aqua dest. gemessen wurden, und der Mittelwert errechnet. Den vorausgegangenen Versuchen mit Chlordiazepoxid und Oxazepam entsprechend, betrug die Schüttelzeit 2x10 Minuten. Die photometrischen Messungen erfolgten bei einem Extinktionsmaximum von 550 nm jeweils 15 Minuten und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Die Meßergebnisse sowohl nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN als auch in der modifizierten Form mit dem in eigenen Versuchen ermittelten optimalen Meßzeitpunkt sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7

Extinktionswerte mit Mittelwerten für 4 Dikaliumchlorazepat-Arbeitsstandards verschiedener Konzentration, hergestellt aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung (100 mg/100 ml).

Konzentration	Extinktion nach 15'	Mittelwert	Extinktion nach 35'	Mittelwert
2,0 mg%	0,040 0,040 0,041	0,040	0,045 0,046 0,049	0,047
4,0 mg%	0,049 0,057 0,060	0,055	0,051 0,065 0,070	0,062
6,0 mg%	0,067 0,070 0,070	0,069	0,076 0,080 0,081	0,079
8,0 mg%	0,079 0,084 0,085	0,083	0,090 0,096 0,098	0,095

Überträgt man die Mittelwerte aus Tabelle 7 auf ein Diagramm, erhält man 2 Kurven.

Die nach 15 Minuten gemessenen Werte ergeben die in Abb. 8 dargestellte Kurve A, die nach 35 Minuten gemessenen Werte Kurve B. Da die Extinktionen nach 35 Minuten konstant bleiben, liegt Kurve B über Kurve A mit den nach 15 Minuten gemessenen Werten.

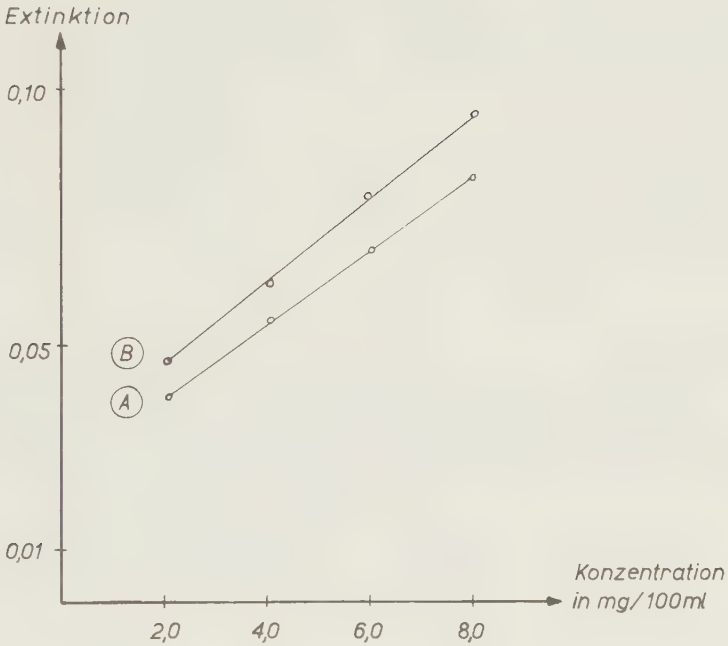


Abb. 8

Extinktionsmittelwerte verschiedener Dikaliumchlorazepat-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 2,0 mg%, 4,0 mg%, 6,0 mg% und 8,0 mg%.

Kurve A: Schüttelzeit 2x10 Minuten
Extinktionsmessung nach 15 Minuten bei 550 nm

Kurve B: Schüttelzeit 2x10 Minuten
Extinktionsmessung nach 35 Minuten bei 550 nm

5. Diskussion der Ergebnisse

Die vorausgegangenen Versuche haben gezeigt, daß neben Chlordiazepoxid auch Oxazepam und Dikaliumchlorazepat aus wässriger Lösung nach der Arbeitsanleitung von FRINGS und COHEN nachgewiesen werden konnten.

Die optimale Zeit bis zur photometrischen Messung, ermittelt in eigenen Versuchen, lag allerdings bei allen drei Benzodiazepinen 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens. Das bedeutet, FRINGS und COHEN sowie GERMANO gegenüber, für je 3 Bestimmungen einen um 20 Minuten längeren Arbeitsgang.

Unter der Voraussetzung, daß nicht mehr als 3 Bestimmungen in Verbindung mit einem Leerwert vorgenommen werden, muß bei Schüttelzeiten von 2x10 Minuten mit einem zeitlichen Aufwand von insgesamt 110 Minuten gerechnet werden. Gegenüber anderen, in der Literatur beschriebenen Verfahren, ist der zeitliche Aufwand gering. Dennoch erhebt sich die Frage, ob Schüttelzeiten von 2x10 Minuten pro Arbeitsgang erforderlich sind. Die folgenden Versuche sollen darüber Aufschluß geben.

II) Versuche zur Herabsetzung der Schüttelzeiten bei der quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung.

1. Extinktionswerte für Chlordiazepoxid mit herabgesetzter Schüttelzeit.

Die folgenden Versuche mit Chlordiazepoxid im wässrigen Milieu sollen zeigen, ob bei einer schrittweisen Reduzierung der Schüttelzeit, die gemessenen Extinktionen in etwa gleich bleiben.

Tabelle 8

Extinktionswerte mit Mittelwerten für einen Chlordiazepoxid-Arbeitsstandard in der Konzentration von 2,0 mg%, ermittelt durch schrittweise Reduzierung der Schüttelzeit von 2x10 Minuten auf 2x30 Sekunden.

Konzentration	Schüttelzeit in min. bzw. sek.	Gemessene Extinktion	Mittelwert
2,0 mg%	2x10'	0,196 0,197 0,204	0,199
2,0 mg%	2x7'	0,197 0,201 0,202	0,200
2,0 mg%	2x4'	0,198 0,200 0,202	0,200
2,0 mg%	2x1'	0,200 0,200 0,203	0,201
2,0 mg%	2x30''	0,197 0,200 0,202	0,200

Aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung (100 mg/100 ml) wurde ein Arbeitsstandard von 2,0 mg% hergestellt. Pro Schüttelzeit erfolgten 3 Bestimmungen, die, den Ergebnissen aus Tabelle 4 entsprechend, 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm gegen einen mitbestimmten Leerwert aus aqua dest. gemessen wurden. Die Reduzierung der Schüttelzeit von 2x10 Minuten auf 2x30 Sekunden geschah in 5 Schritten.

Wie aus Tabelle 8 zu entnehmen ist, entsprechen die nach 2x30 Sekunden Schüttelzeit ermittelten Extinktionswerte eines Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in der Konzentration von 2,0 mg% den nach 2x10 Minuten Schüttelzeit gemessenen Extinktionen.

Dieses Ergebnis ist in Abb. 9 graphisch dargestellt.



Abb. 9

Prüfung der Extinktionsmittelwerte eines Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in der Konzentration von 2,0 mg% mit 5 verschiedenen Schüttelzeiten: 2x10 Minuten, 2x7 Minuten, 2x4 Minuten, 2x1 Minute und 2x30 Sekunden.

Gleichbleibende Extinktionswerte mit herabgesetzter Schüttelzeit bis zu 2x30 Sekunden wurden bei der Wiederfindung von Chlordiazepoxid im wässrigen Milieu bisher nur für eine Konzentration von 2,0 mg% ermittelt.

Die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses wurde in den folgenden Versuchen mit verschiedenen Chlordiazepoxid-Konzentrationen geprüft.

Aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung wurden Arbeitsstandards von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% hergestellt. Für jede Konzentration wurden 5 Versuche mit je 3 Bestimmungen durchgeführt. Die Extinktionsmessungen erfolgten bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gegen einen mitbestimmten Leerwert aus aqua dest.

Tabelle 9

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 2 Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg% und 1,0 mg%, gemessen - nach 2x30 Sekunden Schütteln - bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Konzentration 0,5 mg%		Konzentration 1,0 mg%	
Gemessene Extinktion	Mittelwert	Gemessene Extinktion	Mittelwert
0,049 0,050 0,050	0,050	0,097 0,099 0,100	0,098
0,048 0,048 0,049	0,049	0,099 0,100 0,100	0,100
0,049 0,050 0,051	0,050	0,098 0,101 0,102	0,100
0,050 0,050 0,051	0,050	0,099 0,100 0,102	0,100
0,050 0,051 0,051	0,051	0,100 0,101 0,102	0,101

Tabelle 10

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 2 Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 2,0 mg% und 4,0 mg%, gemessen - nach 2x30 Sekunden Schütteln - bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Konzentration 2,0 mg%		Konzentration 4,0 mg%	
Gemessene Extinktion	Mittelwert	Gemessene Extinktion	Mittelwert
0,196 0,198 0,200	0,198	0,390 0,395 0,410	0,398
0,199 0,199 0,200	0,199	0,396 0,398 0,401	0,398
0,200 0,200 0,201	0,200	0,391 0,405 0,405	0,400
0,198 0,200 0,203	0,200	0,395 0,402 0,407	0,401
0,198 0,202 0,204	0,201	0,400 0,405 0,410	0,405

Die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen jeder Konzentration aus Tabelle 9 und 10 werden in ein Diagramm (Abb. 10) übertragen und ergeben eine Gerade.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die nach 2x30 Sekunden Schüttelzeit ermittelten Extinktionswerte von 4 Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in den Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% den nach 2x10 Minuten Schüttelzeit gemessenen Ergebnissen in Tabelle 5 entsprechen. Die Extinktionsmessungen erfolgten immer 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm.

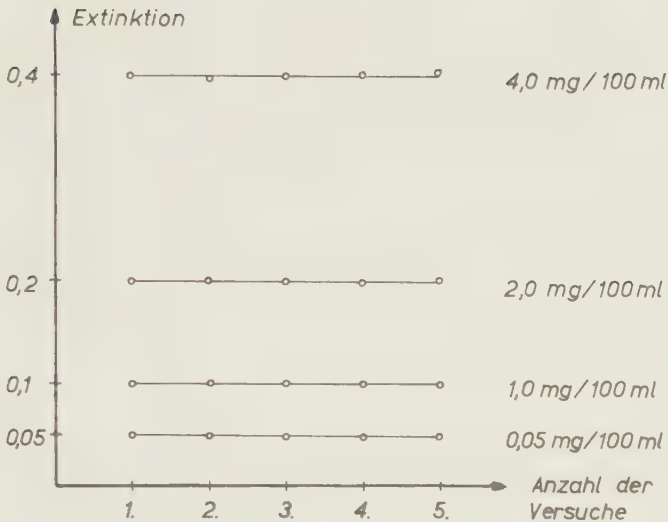


Abb. 10

Prüfung der Extinktionsmittelwerte von 4 verschiedenen Arbeitsstandards (Chlordiazepoxid-Konzentrationen 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg%) mit der neu gefundenen Schüttelzeit von 2x30 Sekunden.

Da die Extinktionsergebnisse mit herabgesetzter Schüttelzeit auf 2x30 Sekunden weitgehend denen mit 2x10 Minuten Schüttelzeit entsprechen, ist die graphische Darstellung einer Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid in wässriger Lösung an dieser Stelle nicht erforderlich. Sie ist identisch mit der in eigenen Versuchen ermittelten Eichkurve in Abb. 6.

2. Extinktionswerte für Oxazepam mit herabgesetzter Schüttelzeit.

Oxazepam ließ sich aus wässrigem Milieu nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN (bei Extinktionsmessung nach 35 Minuten) offenbar gut extrahieren und lieferte die in Abb. 7 dargestellte Eichkurve.

In den nächsten Versuchen soll geprüft werden, ob - wie bei Chlordiazepoxid - mit einer Schüttelzeit von 2x30 Sekunden für verschiedene Konzentrationen Extinktionswerte gemessen werden können, die den Werten nach 2x10 Minuten Schütteln entsprechen.

Tabelle 11

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 5 Oxazepam-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg% - gemessen, nach 2x30 Sekunden Schütteln bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Konzentration	Gemessene Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,098 0,100 0,100	0,099
1,0 mg%	0,198 0,199 0,199	0,199
2,0 mg%	0,396 0,399 0,405	0,400
3,0 mg%	0,580 0,595 0,603	0,593 ⁺)
4,0 mg%	0,735 0,740 0,760	0,745 ⁺⁺)

+) Messung erfolgte nach 40 Minuten

++) Messung erfolgte nach 45 Minuten

Aus einer Oxazepam-Stammlösung waren 5 Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg% hergestellt worden. Die Extinktionen, aus je 3 Bestimmungen pro Konzentration, galt es wieder bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gegen einen mitbestimmten Leerwert aus aqua dest. zu messen und mit den Extinktionswerten in Tabelle 6 zu vergleichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert Tabelle 11.

Aufgrund der Versuchsergebnisse kann man feststellen, daß die Extinktionswerte von 5 Oxazepam-Arbeitsstandards in den Konzentrationen 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg%, ermittelt nach 2x30 Sekunden Schüttelzeit, im Mittel den Ergebnissen entsprechen, die nach 2x10 Minuten Schütteln bei 550 nm ebenfalls nach 35 Minuten gemessen wurden (Tabelle 6).

Daraus resultiert, daß hier die graphische Darstellung einer Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Oxazepam in wässriger Lösung mit herabgesetzter Schüttelzeit auf 2x30 Sekunden unterbleiben kann. Der Kurvenverlauf ist identisch mit der Eichkurve B in Abb. 7, die in Versuchen mit 2x10 Minuten Schütteln ermittelt wurde.

3. Extinktionswerte von Dikaliumchlorazepat mit herabgesetzter Schüttelzeit

In den ersten eigenen Versuchen mit Dikaliumchlorazepat wurde bereits festgestellt, daß sich dieses 1,4 Benzodiazepin unter den Bedingungen von FRINGS und COHEN aus wässriger Lösung offenbar nur schwer extrahieren läßt. Eine Reduzierung der Schüttelzeit erscheint daher nicht sinnvoll. Die Versuchsreihe wurde dennoch durchgeführt, nicht zuletzt,

um die Ergebnisse, die nach 2x10 Minuten Schütteln gemessen wurden, zu überprüfen (Tabelle 7).

Von jedem Arbeitsstandard in Konzentrationen von 2,0 mg%, 4,0 mg%, 6,0 mg% und 8,0 mg%, hergestellt aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung, gelangten 3 Bestimmungen zum Nachweis von Dikaliumchlorazepat zur Messung. Den vorausgegangenen Versuchen entsprechend, betrug die Schüttelzeit 2x30 Sekunden. Die photometrischen Messungen erfolgten bei 550 nm jeweils 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gegen einen mitbestimmten Leerwert aus aqua dest.

Tabelle 12

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 4 Dikaliumchlorazepat-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 2,0 mg%, 4,0 mg%, 6,0 mg% und 8,0 mg%, gemessen - nach 2x30 Sekunden Schütteln - bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Konzentration	Gemessene Extinktion nach 35'	Mittelwert
2,0 mg%	0,017 0,018 0,018	0,018
4,0 mg%	0,039 0,040 0,040	0,040
6,0 mg%	0,051 0,052 0,052	0,052
8,0 mg%	0,061 0,062 0,062	0,062

In Abb. 11 sind die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen von Dikaliumchlorazepat aus 3 Bestimmungen pro Konzentration auf ein Diagramm übertragen und ergeben Kurve A.

Zum Vergleich sind die Mittelwerte der Extinktionen von Dikaliumchlorazepat, die nach 2x10 Minuten Schütteln und nach 15 Minuten bzw. 35 Minuten gemessen wurden (Tab. 7), in Kurve B bzw. Kurve C noch einmal dargestellt.

Auf Grund der Versuchsergebnisse läßt sich folgendes sagen:

Bei einer Schüttelzeit von 2x30 Sekunden liegen die gemessenen Extinktionen von 4 Arbeitsstandards in den Konzentrationen 2,0 mg%, 4,0 mg%, 6,0 mg% und 8,0 mg% deutlich unter den Werten, die nach 2x10 Minuten Schütteln und nach 15 Minuten bzw. 35 Minuten gemessen wurden.

Die Versuche bestätigen, daß sich Dikaliumchlorazepat aus wässriger Lösung nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN offenbar sehr schwer extrahieren läßt.

Keine der in Abb. 11 dargestellten Kurven erfüllt das Beer'sche Gesetz und eignet sich somit nicht als Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung.

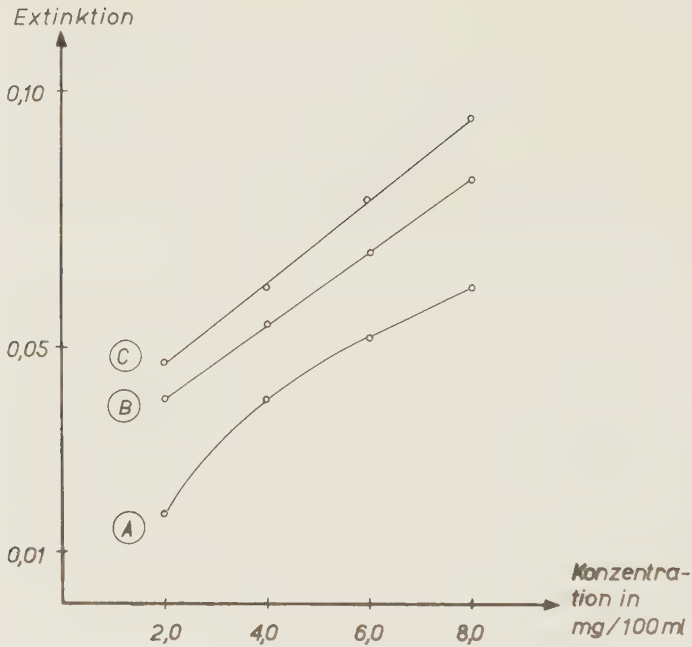


Abb. 11

Extinktionen aus 4 Dikaliumchlorazepat-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 2,0 mg%, 4,0 mg%, 6,0 mg% und 8,0 mg%.

Kurve A Schüttelzeit 2x30 Sekunden

Extinktionsmessung nach 35 Minuten bei 550 nm

Kurve B Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessung nach 15 Minuten bei 550 nm

Kurve C Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessung nach 35 Minuten bei 550 nm

III) Ergebnisse der Versuche zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum.

Die zurückliegenden Versuche haben gezeigt, daß für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung

- a) die optimale Meßzeit 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens liegt und
- b) eine Reduzierung der Schütteldauer von 2x10 Minuten auf 2x30 Sekunden im Mittel die gleichen Ergebnisse liefert.

In den folgenden Versuchen soll geprüft werden, ob die bisherigen Ergebnisse mit wässriger Lösung den Ergebnissen mit Serum gleichen oder ob eventuell Abweichungen auftreten.

1.) Arbeitsbedingungen

Die aus den Versuchen mit wässriger Lösung gefundene optimale Meßzeit von 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens wurde in allen Versuchen mit Serum übernommen.

Probemessungen mit Serum über ca. 1 Stunde wiesen nach 35 Minuten ein gleichbleibendes Extinktionsmaximum auf. Daraufhin erfolgten alle Extinktionsmessungen zur Kontrolle nach den Angaben von FRINGS und COHEN 15 Minuten und nach der neu gefundenen Meßzeit 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Die Ergebnisse - ermittelt mit der optimalen Meßzeit - dienten bei der anschließenden schrittweisen Reduzierung der Schütteldauer als Basiswerte.

2.) Bestimmung des Leerwertes für Serum

Um den Serum-Leerwert festzustellen, wurden zuerst die Extinktionswerte aus dem Serum von 10 Probanden ohne eine Chlordiazepoxid-, Oxazepam- oder Dikaliumchlorazepat-Einnahme gemessen und gegen einen mitbestimmten Leerwert aus aqua dest verglichen. Um ein gesichertes Ergebnis zu haben,

wurde jede Bestimmung 2x10 Minuten geschüttelt. Dabei ergaben sich folgende Extinktionswerte, die in Tabelle 13 zusammengefaßt sind.

Tabelle 13

Extinktionswerte aus dem Serum von 10 Probanden ohne Chlordiazepoxid-, Oxazepam- oder Dikaliumchlorazepat-Einnahme bzw. -Zusatz. Die Messung erfolgte nach 2x10 Minuten Schütteln bei 550 nm gegen einen mitbestimmten Leerwert aus aqua dest. 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Probanden	Extinktion	Probanden	Extinktion
Nr. 1	0,000	Nr. 6	-0,001
Nr. 2	-0,001	Nr. 7	0,000
Nr. 3	0,000	Nr. 8	0,000
Nr. 4	-0,002	Nr. 9	0,000
Nr. 5	+0,001	Nr. 10	-0,001

Die Extinktionswerte aus dem Serum von 10 Probanden ohne Chlordiazepoxid-, Oxazepam- oder Dikaliumchlorazepat-Einnahme bzw. -Zusatz sind im Mittel praktisch 0,000. Geringfügige Abweichungen von -0,001 oder +0,001 können unberücksichtigt bleiben, da es sich hier um Meßdifferenzen des Photometers oder feinste Unreinheiten in den Meßsubstanzen handeln kann.

Berechnet man die dreifache Standardabweichung für den Serum-Leerwert mit Hilfe der Formel

(s_x = Standardabweichung)

erhält man einen Wert von 0,0025.

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

Das Ergebnis läßt den Schluß zu, daß in allen folgenden Versuchen mit Serum, wie bei wässrigen Lösungen, gegen einen mitbestimmten Leerwert aus aqua dest. gemessen werden kann.

3.) Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum mit 2x10 Minuten Schütteldauer.

Zur Herstellung der Analysenlösungen wurde das tiefgefrorene Pool-Serum am Morgen der Tiefkühltruhe entnommen. Wenn das Serum Zimmertemperatur erreicht hatte, konnten mit der jeweiligen Stammlösung die verschiedenen Arbeitsstandards unterschiedlicher Konzentration hergestellt werden.

Es hat sich für die gute Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse als günstig erwiesen, das Serum mit dem Benzodiazepinzusatz in braunen Glasflaschen bei Zimmertemperatur ca. 16 Stunden (über Nacht) zu lagern.

a) Extinktionswerte für Chlordiazepoxid

Zum Nachweis von Chlordiazepoxid im Serum wurden aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung (100 mg/100 ml) 4 verschiedene Arbeitsstandards in den Konzentrationen 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% wie folgt hergestellt:

0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml und 0,4 ml - das entspricht 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg und 0,4 mg gelöstem Chlordiazepoxid - werden aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung entnommen, mit Serum auf 10 ml in geeichte Meßkolben ergänzt und in braunen Glasflaschen bei Zimmertemperatur, wie oben beschrieben, aufbewahrt.

Die erste Versuchsserie verlief nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN, d.h. mit 2x10 Minuten Schütteln und mit Messung nach 15 Minuten bei 550 nm. Im Anschluß daran erfolgten die Messungen nach der optimalen Meßzeit von 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens ebenfalls bei 550 nm. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 4 Seren, denen 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml bzw. 0,4 ml Chlordiazepoxid aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung (100 mg/100 ml) zugesetzt wurde, so daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% entstanden. Schüttelzeit 2x10 Minuten, Extinktionsmessung 15 Minuten und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Konzentration	Extinktion nach 15'	Mittelwert	Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,030 0,030 0,031	0,030	0,049 0,050 0,050	0,050
1,0 mg%	0,072 0,078 0,079	0,076	0,097 0,099 0,100	0,099
2,0 mg%	0,145 0,149 0,150	0,148	0,195 0,198 0,200	0,198
4,0 mg%	0,329 0,339 0,342	0,337	0,409 0,415 0,426	0,417

Die Werte in Tabelle 14 zeigen, daß die nach 15 Minuten gemessenen Extinktionen deutlich unter den nach 35 Minuten gemessenen liegen. Mit dem optimalen Meßzeitpunkt von 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens wurde für Konzentrationen von 0,5 mg% bis 4,0 mg% bei Chlordiazepoxid im Serum im Mittel die gleichen Extinktionen gemessen wie in wässriger Lösung (s. Tab. 5).

Die Ergebnisse aus Tabelle 14 sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

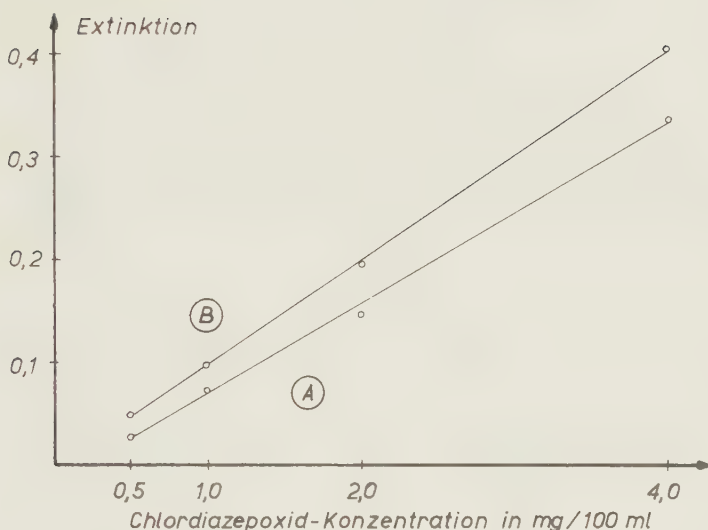


Abb. 12

Extinktionsmittelwerte aus Seren verschiedener Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg%.

Kurve A: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 15 Minuten bei 550 nm

Kurve B: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm

Die Kurve B in Abb. 12, ermittelt mit Schüttelzeiten von 2x10 Minuten und Extinktionsmessungen nach 35 Minuten, ist im Bereich von 0,5 mg% bis 4,0 mg% linear und weist für jede geprüfte Konzentration die gleichen Extinktionswerte auf wie bei Messung aus wässriger Lösung.

Damit entspricht sie den Kurven, die mit gleicher und herabgesetzter Schüttelzeit ebenfalls 35 Minuten nach Zugabe des

Kupplungsreagens für Chlordiazepoxid in wässriger Lösung ermittelt wurden (s. Seite 27 und 39).

b) Extinktionswerte für Oxazepam

Der Nachweis von Oxazepam im Serum verläuft nach dem gleichen Prinzip wie bei Chlordiazepoxid. Aus einer Oxazepam-Stammlösung (100 mg/100 ml) werden 5 verschiedene Arbeitsstandards in den Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg% hergestellt.

Man entnimmt der Stammlösung 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml und 0,4 ml - das entspricht 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg und 0,4 mg gelöstem Oxazepam - und ergänzt mit Serum auf 10 ml in geeichte Meßkolben. In braunen Glasflaschen sollte die Lösung bei Zimmertemperatur, wie oben beschrieben, ca. 16 Stunden aufbewahrt werden.

Nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN - also 2x10 Minuten Schütteln - wurden die Extinktionen nach 15 Minuten gemessen. Zusammen mit diesen Werten befinden sich in Tabelle 15 die Werte, die mit 2x10 Minuten Schütteln und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gemessen wurden.

Die Extinktionsmittelwerte aus den Seren entsprachen denjenigen aus wässriger Lösung. Der optimale Meßzeitpunkt stellte sich bei einer Konzentration von 3,0 mg% ebenfalls erst nach 40 Minuten bzw. bei 4,0 mg% nach 45 Minuten ein. Längere Wartezeiten ergaben in beiden Fällen gleichbleibende Maxima.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tabelle 15

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 5 Seren, denen 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml bzw. 0,4 ml Oxazepam aus einer Oxazepam-Stammlösung (100 mg/100 ml) zugesetzt wurde, so daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg% entstanden. Schüttelzeit 2x10 Minuten, Extinktionsmessung 15 Minuten und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Konzentration	Extinktion nach 15'	Mittelwert	Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,077 0,078 0,078	0,078	0,097 0,100 0,100	0,099
1,0 mg%	0,160 0,160 0,161	0,160	0,199 0,201 0,201	0,200
2,0 mg%	0,310 0,309 0,320	0,313	0,391 0,392 0,409	0,397
3,0 mg%	0,468 0,462 0,480	0,470	0,590 0,599 0,600	0,596 ⁺⁾
4,0 mg%	0,570 0,568 0,569	0,569	0,718 0,722 0,729	0,723 ⁺⁺⁾

⁺⁾ Messung erfolgte nach 40 Minuten

⁺⁺⁾ Messung erfolgte nach 45 Minuten

Die Mittelwerte aus 3 Bestimmungen pro Konzentration liefern die in Abb. 13 dargestellten Kurven.

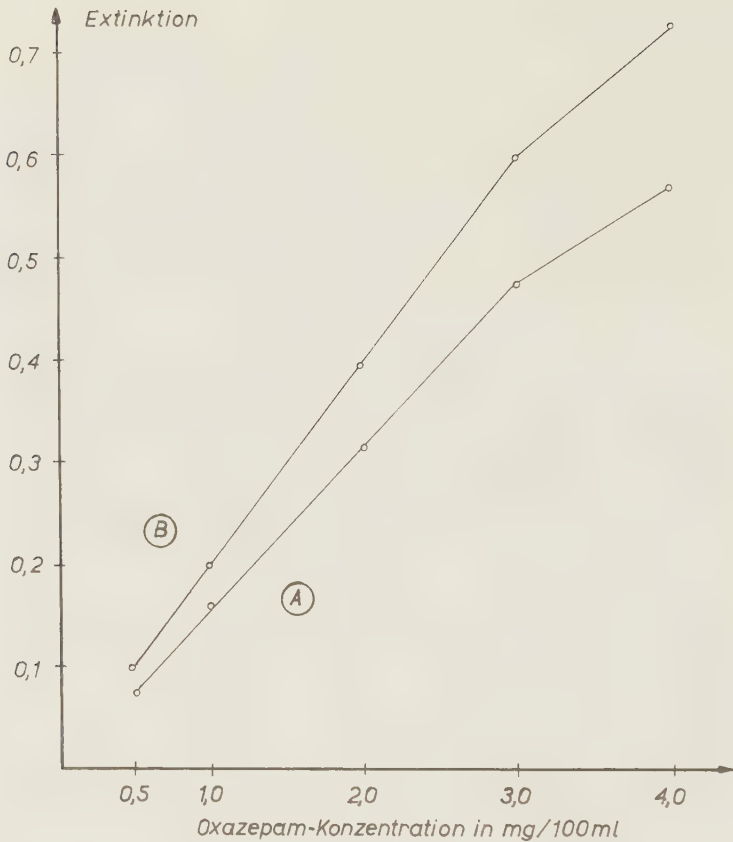


Abb. 13

Extinktionsmittelwerte aus Seren verschiedener Oxazepam-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 3,0 mg% und 4,0 mg%.

Kurve A: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 15 Minuten bei 550 nm

Kurve B: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm

Die Kurve B in Abb. 13, ermittelt mit Schüttelzeiten von 2×10 Minuten und Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bzw. 40 Minuten, ist im Bereich von 0,5 mg% bis 3,0 mg% linear und weist für jede geprüfte Konzentration die gleichen Extinktionswerte auf wie bei Messung aus wässriger Lösung. Sie entspricht damit in ihrem Verlauf den Kurven, die mit gleicher und herabgesetzter Schüttelzeit (2×30 Sekunden) ebenfalls 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens für Oxazepam in wässriger Lösung ermittelt wurden (siehe Seite 30 und 41).

c) Extinktionswerte für Dikaliumchlorazepat

Nach den Erfahrungen mit Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung galt das besondere Interesse dem Dikaliumchlorazepat-Zusatz zu Serum.

Probemessungen zur Bestimmung von Dikaliumchlorazepat als Zusatz im Serum mit einer Konzentration von 2,0 mg% lieferten überraschend hohe Extinktionen. So wurden Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 4,0 mg% und 6,0 mg% wie folgt hergestellt:

Aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung wurden 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml und 0,6 ml - das entspricht 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg bzw. 0,6 mg gelöstem Dikaliumchlorazepat - entnommen und mit Serum auf je 10 ml ergänzt. Um gute Meßergebnisse zu erzielen, blieben die Lösungen, wie oben beschrieben, ca. 16 Stunden bei Zimmertemperatur in braunen Glasflaschen aufbewahrt.

In der ersten Versuchsreihe wurde wieder nach den Bedingungen von FRINGS und COHEN verfahren, also 2×10 Minuten geschüttelt und 15 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gemessen.

In einer zweiten Meßreihe wurden die 3 Bestimmungen pro

Konzentration nach der optimalen Wartezeit von 35 Minuten gemessen.

Eine Zusammenfassung der Meßergebnisse liefert Tab. 16.

Tabelle 16

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 5 Seren, denen 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml und 0,6 ml Dikaliumchlorazepat aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung (100 mg/100 ml) zugesetzt wurde, so daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 4,0 mg% und 6,0 mg% entstanden. Die Schüttelzeit betrug 2x10 Minuten, die Extinktionsmessungen erfolgten 15 Minuten und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm.

Konzen- tration	Extinktion nach 15'	Mittel- wert	Extinktion nach 35'	Mittel- wert
0,5 mg%	0,040 0,041 0,041	0,041	0,049 0,049 0,052	0,050
1,0 mg%	0,082 0,084 0,087	0,084	0,098 0,099 0,105	0,101
2,0 mg%	0,160 0,160 0,164	0,161	0,197 0,199 0,204	0,200
4,0 mg%	0,318 0,320 0,327	0,322	0,395 0,402 0,410	0,402
6,0 mg%	0,477 0,478 0,482	0,479	0,591 0,601 0,617	0,603 ^{+))}

^{+))} Messung erfolgte 45 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Die Mittelwerte aus 3 Bestimmungen pro Konzentration liefern die in Abb. 14 dargestellten Kurven.

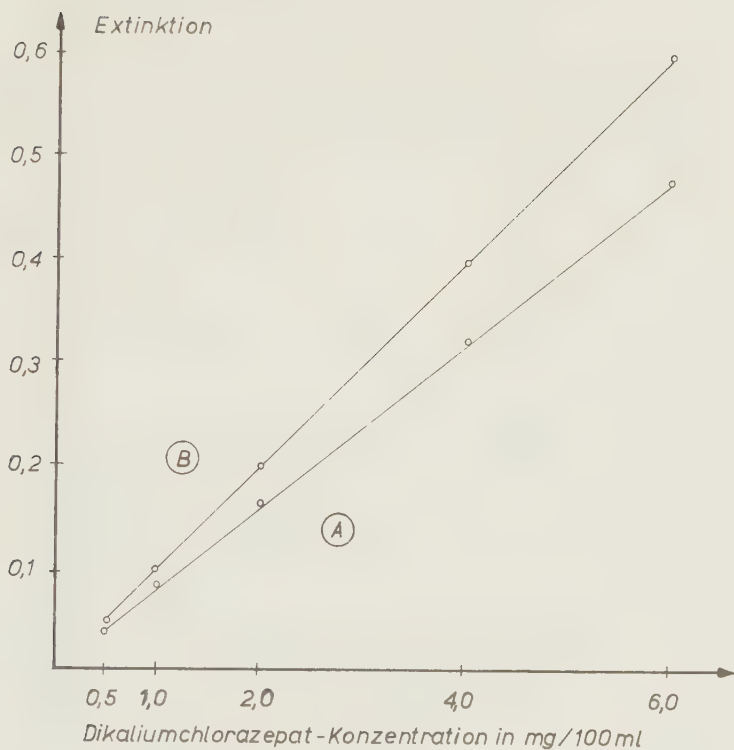


Abb. 14

Extinktionsmittelwerte aus 5 Seren verschiedener Dikaliumchlorazepat-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg%, 4,0 mg% und 6,0 mg%.

Kurve A: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 15 Minuten bei 550 nm

Kurve B: Schüttelzeit 2x10 Minuten

Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm

Die Extinktionsmessungen mit Dikaliumchlorazepat als Zusatz im Serum führten zu überraschenden Ergebnissen:

1. Dikaliumchlorazepat läßt sich aus dem Serum besser extrahieren als aus wässriger Lösung.
2. Konzentrationen von 0,5 mg% liefern bereits mittlere Extinktionen von 0,05 . (In wässriger Lösung ist Dikaliumchlorazepat erst ab ca. 2,0 mg% nachweisbar).
3. Die Kurve B in Abb. 14 ist von 0,5 mg% bis 6,0 mg% linear und dient als Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat im Serum. (Versuche mit höheren Konzentrationen wurden nicht vorgenommen.)

d) Diskussion der Ergebnisse

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Versuche zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum zu guten Ergebnissen geführt haben. Für die 3 genannten Benzodiazepine konnte je eine Eichkurve erstellt werden. Dabei wurde nach der Arbeitsanleitung von FRINGS und COHEN vorgegangen, also 15 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gemessen und in Abänderung davon nach 35 Minuten. Als optimale Wartezeit haben sich in allen zurückliegenden Versuchen (einschließlich der Probestimmungen) 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens erwiesen.

Die Eichkurven zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat entstanden alle aus Mittelwerten (berechnet aus drei Bestimmungen pro Konzentration), die mit Schüttelzeiten von 2×10 Minuten und Extinktionsmessung nach 35 Minuten bei 550 nm ermittelt wurden.

4.) Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum mit reduzierter Schüttelzeit.

Nachdem die Reduzierung der Schüttelzeit bei wässrigen Lösungen zu erfolgreichen Ergebnissen geführt hat, soll in den nächsten Versuchen geprüft werden, ob die Senkung der Schüttelzeit für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat als Zusatz im Serum ähnlich gute Resultate liefert.

a) Extinktionswerte und Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum mit herabgesetzter Schüttelzeit.

Die Herstellung der verschiedenen Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards ist im vorherigen Kapitel ausführlich beschrieben und darf deshalb als bekannt vorausgesetzt werden. Wie bisher wurden 3 Bestimmungen pro Konzentration vorgenommen und bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gemessen.

Die Versuche mit Chlordiazepoxid-Zusatz im Serum führten gegenüber den Ergebnissen wässriger Lösungen (bei Schüttelzeiten von 2x30 Sekunden und Extinktionsmessung nach 35 Minuten bei 550 nm) zu geringen Abweichungen.

So wurde in der 2. Versuchsserie die Schüttelzeit von 2x30 Sekunden auf 2x1 Minute erhöht. Für jede geprüfte Konzentration wurde dabei die gleiche Extinktion gemessen wie bei einer Schütteldauer von 2x10 Minuten (s. Tab. 14).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 17. Die Übertragung der Mittelwerte ergab die in Abb. 15 dargestellten Kurven.

Tabelle 17

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 5 Seren, denen 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml und 0,4 ml Chlordiazepoxid aus einer Chlordiazepoxid-Stammlösung (100 mg/100 ml) zugesetzt wurde, so daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% entstanden. Schüttelzeit im 1. Durchgang 2x30 Sekunden, im 2. Durchgang 2x1 Minute. Extinktionsmessung 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm.

Konzentration	Schüttelzeit 2x30 Sek.		Schüttelzeit 2x1 Min.	
	Extinktion nach 35'	Mittelwert	Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,041 0,043 0,044	0,043	0,047 0,049 0,052	0,049
1,0 mg%	0,097 0,100 0,101	0,099	0,097 0,097 0,100	0,098
2,0 mg%	0,202 0,197 0,195	0,198	0,199 0,201 0,205	0,202
4,0 mg%	0,388 0,391 0,390	0,390	0,388 0,402 0,416	0,402

Aus Tabelle 17 ist ersichtlich, daß der Nachweis von Chlordiazepoxid im Serum als 2-Amino-5-chlorbenzophenon bei einer Schüttelzeit von 2x30 Sekunden nicht in allen Konzentrationen zu 100 % gelang. Bei einer Konzentration von 0,5 mg% liegt die Extinktion von 0,043 um 14% unter dem Richtwert, der mit 2x10 Minuten Schütteln gemessen wurde (s. Tab. 14).

2x1 Minute Schütteln führt aber bereits in jeder geprüften Konzentration zu gleicher Extinktion wie bei 2x10 Minuten Schütteln.

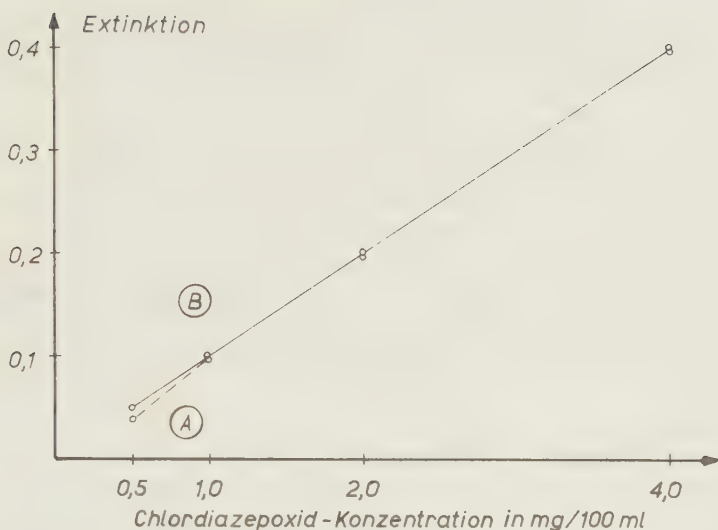


Abb. 15

Herstellung einer Eichkurve (Kurve B) zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum, ermittelt aus 4 Seren in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg%.

Kurve A: Schüttelzeit 2x30 Sekunden

Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm

Kurve B: Schüttelzeit 2x1 Minute

Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm

Aufgrund der Ergebnisse kann man sagen, daß zur Herstellung einer Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum eine Schüttelzeit von 2x1 Minute genügt. Die Extinktionsmessungen sollten 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm erfolgen. Die Kurve B in Abb. 15 stellt eine Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum dar.

b) Extinktionswerte und Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Oxazepam im Serum mit herabgesetzter Schüttelzeit.

Die 4 Oxazepam-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 3,0 mg% wurden in bekannter Weise aus einer Oxazepam-Stammlösung hergestellt. Es wurden 3 Bestimmungen pro Konzentration vorgenommen und bei 550 nm 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens gemessen. Die Schütteldauer betrug, den Ergebnissen aus wässriger Lösung entsprechend, 2x30 Sekunden.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 18.

Tabelle 18

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 4 Seren, denen 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml und 0,3 ml Oxazepam aus einer Oxazepam-Stammlösung (100 mg/100 ml) zugesetzt wurde, so daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 3,0 mg% entstanden. Schüttelzeit 2x30 Sekunden, Extinktionsmessung 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm.

Konzentration	Schüttelzeit 2x30 Sekunden Gemessene Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,092 0,093 0,096	0,094
1,0 mg%	0,182 0,185 0,191	0,186
2,0 mg%	0,340 0,350 0,370	0,353
3,0 mg%	0,558 0,568 0,578	0,568 ⁺)

⁺) Messung erfolgte nach 40 Minuten

Die Mittelwerte mit 2x30 Sekunden Schütteldauer und zum Vergleich mit 2x10 Minuten Schütteldauer werden in ein Diagramm übertragen, dargestellt in Abb. 16.

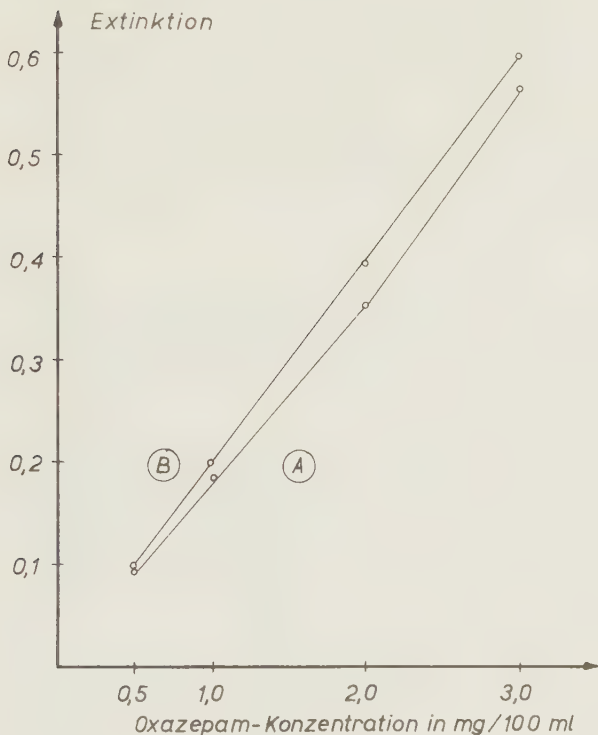


Abb. 16

Extinktionsmittelwerte aus 4 Seren verschiedener Oxazepam-Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 3,0 mg%

Kurve A: Schüttelzeit 2x30 Sekunden
Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm

Kurve B: Schüttelzeit 2x10 Minuten
Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm
(Tab. 15 und Abb. 13)

Da die Extinktionen bei der Bestimmung von Oxacepam im Serum mit 2x30 Sekunden Schütteldauer nicht den Werten mit 2x10 Minuten Schütteldauer entsprechen (sie liegen durchschnittlich 7 % niedriger), mußte eine neue Schüttelzeit ermittelt werden.

Mit einem Oxacepam-Arbeitsstandard in der Konzentration von 2,0 mg% wurden jeweils 3 Bestimmungen 2x10 Minuten, 2x5 Minuten, 2x3 Minuten, 2x2 Minuten und 2x1 Minute geschüttelt und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm gemessen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse finden sich in Tab. 19. Die Übertragung der Mittelwerte ergibt die in Abb. 17 dargestellte Kurve.

Tab. 19

Mit verschiedenen Schüttelzeiten gemessene Extinktionswerte aus einem mit 2,0 mg% Serum hergestellten Oxacepam-Arbeitsstandard in der Konzentration von 2,0 mg%. Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm.

Konzentration	Schüttelzeit in Min. bzw. Sek.	Gemessene Extinktion	Mittelwert
2,0 mg%	2x10'	0,390	0,399
		0,392	
		0,415	
2,0 mg%	2x5'	0,394	0,398
		0,400	
		0,400	
2,0 mg%	2x3'	0,392	0,399
		0,395	
		0,410	
2,0 mg%	2x2'	0,399	0,401
		0,400	
		0,403	
2,0 mg%	2x1'	0,375	0,381
		0,380	
		0,387	
2,0 mg%	2x30''	0,340	0,353
		0,350	
		0,370	

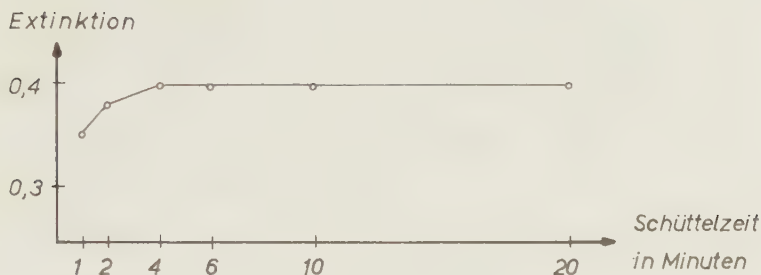


Abb. 17

Prüfung der Extinktionen zur quantitativen Bestimmung von Oxazepam im Serum mit verschiedenen Schüttelzeiten. Konzentration des Arbeitsstandards 2,0 mg%.

Tabelle 20

Nach Schüttelzeiten von 2x2 Minuten gemessene Extinktionen mit Mittelwerten aus 4 Seren, denen soviel Oxazepam aus einer Oxazepam-Stammlösung zugesetzt wurde, daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 3,0 mg% entstanden. Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm.

Schüttelzeit 2x2 Minuten		
Konzentration	Gemessene Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,097	0,099
	0,099	
	0,100	
1,0 mg%	0,195	0,200
	0,199	
	0,205	
2,0 mg%	0,389	0,397
	0,399	
	0,403	
3,0 mg%	0,590	0,593
	0,592	
	0,597	

Die neue Schüttelzeit von 2x2 Minuten, gefunden mit einem Oxazepam-Kupplungsstandard in der Konzentration von 2,0 mg%, lieferte auch für die Konzentrationen 0,5 mg%, 1,0 mg% und 4,0 mg% Extraktionen, die den Werten mit 2x10 Minuten Extraktion entsprachen. Die Eichkurven zeigen also den gleichen Verlauf.

Aufgrund der Versuchsergebnisse kann man sagen, daß zur Herstellung einer Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Oxazepam im Serum eine Schütteldauer von 2x2 Minuten genügt. Die Extinktionsmessungen sollten 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm erfolgen.

Kurve B in Abb. 16 stellt eine Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Oxazepam im Serum dar.

3. Extraktionswerte und Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat im Serum mit herabgesetzter Schüttelzeit.

Während sich interessanterweise Dikaliumchlorazepat aus dem Serum besser extrahieren ließ als aus wässriger Lösung, war zu hoffen, daß mit einer Reduzierung der Schüttelzeit eine beschleunigte Nachweismethode auch für Dikaliumchlorazepat in starker Anlehnung an das von FRINGS und COHEN beschriebene Verfahren gefunden werden konnte.

Aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung (100 mg/100 ml) wurden mit je 10 ml Serum Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% in bekannter Weise hergestellt. Jede Bestimmung - 3 pro Konzentration - wurde zuerst nach 30 Sekunden, den Ergebnissen aus wässriger Lösung entsprechend, geschüttelt und 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm gemessen. Eine Zusammenfassung der Werte findet sich in Tabelle 21.

Tabelle 21

Extinktionswerte mit Mittelwerten aus 4 Seren, denen 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml und 0,4 ml Dikaliumchlorazepat aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung (100 mg/100 ml) zugesetzt wurde, so daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% entstanden. Schüttelzeit 2x30 Sekunden, Extinktionsmessung 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm.

Schüttelzeit 2x30 Sekunden		
Konzentration	Gemessene Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,025	0,036
	0,035	
	0,037	
1,0 mg%	0,069	0,070
	0,070	
	0,071	
2,0 mg%	0,155	0,163
	0,163	
	0,170	
4,0 mg%	0,335	0,341
	0,340	
	0,347	

Die gemessenen Extinktionen liegen weit unter den Werten, die nach 2x10 Minuten Schütteldauer erreicht wurden und in Tabelle 16 zusammengefaßt sind. Die Graphik (Abb. 18) veranschaulicht die Differenz von rund 30 % sehr deutlich.

Um zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat im Serum eine neue Schüttelzeit zu bekommen, wurden mit einer Konzentration von 4,0 mg% jeweils 3 Bestimmungen mit Schüttelzeiten von 2x10 Minuten, 2x5 Minuten, 2x3 Minuten und 2x1 Minute vorgenommen.

Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich in Tab. 22 und Abb. 19.

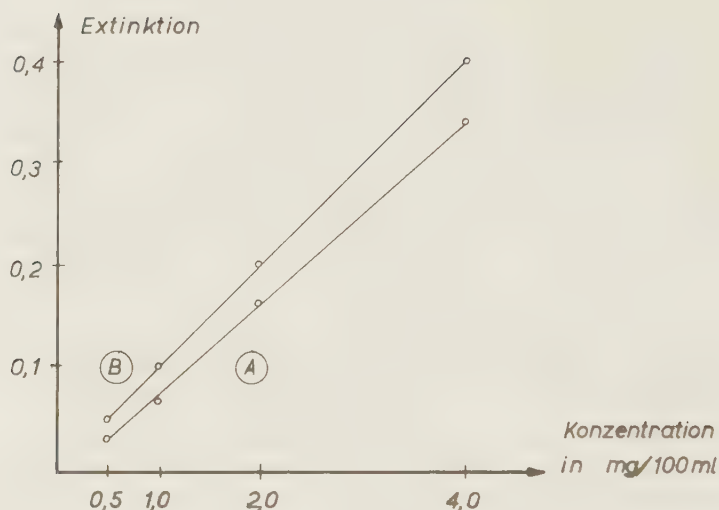


Abb. 18

Kurve A wird gebildet aus Mittelwerten - bei 3 Bestimmungen pro Konzentration - von 4 Serumproben, denen Dikaliumchlorazepat aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung so zugesetzt wurde, daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% entstanden. Schüttelzeit 2x30 Sekunden, Extinktionsmessung nach 35 Minuten bei 550 nm.

Kurve B - zum Vergleich - ist die Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat im Serum, ermittelt mit einer Schüttelzeit von 2x10 Minuten und Extinktionsmessung nach 35 Minuten (Tab. 16 und Abb. 14).

Tabelle 22

Mit verschiedenen Schüttelzeiten gemessene Extinktionen aus einem mit 10 ml Serum hergestellten Dikaliumchlorazepat-Arbeitsstandard in der Konzentration von 4,0 mg%. Extinktionsmessungen nach 35 Minuten bei 550 nm.

Konzentration	Schüttelzeit in Min. bzw. Sek.	Gemessene Extinktion	Mittelwert
4,0 mg%	2x10'	0,390 0,397 0,409	0,399
4,0 mg%	2x5'	0,401 0,402 0,396	0,400
4,0 mg%	2x3'	0,350 0,355 0,366	0,357
4,0 mg%	2x1'	0,320 0,350 0,350	0,340

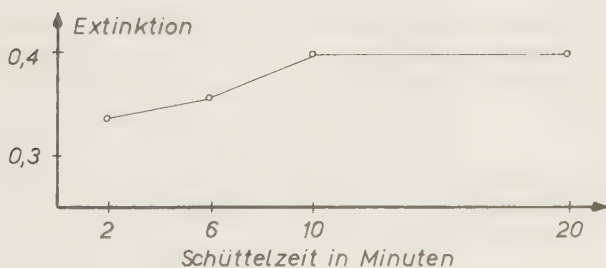


Abb. 19

Prüfung der Extinktionen zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat im Serum mit verschiedenen Schüttelzeiten. Konzentration des Arbeitsstandards 4,0 mg%.

Aus Tabelle 22 ist ersichtlich, daß für eine Dikaliumchlorazepat-Konzentration von 4,0 mg% in Versuchen mit verschiedenen Schüttelzeiten nach 2x5-minütiger Schüttelung die gleiche Extinktion gemessen wurde wie nach 2x10-minütiger Schüttelung. Die Extinktionen für die Konzentrationen 0,5 mg%, 1,0 mg% und 2,0 mg% bestätigen das Ergebnis und sind mit den Mittelwerten aus 5 Bestimmungen pro Konzentration in Tabelle 23 zusammengefaßt.

Tabelle 23

Nach Schüttelzeit von 2x5 Minuten gemessene Extinktionen mit Mittelwerten aus 4 Serien, denen soviel Dikaliumchlorazepat aus einer Dikaliumchlorazepat-Stammlösung zugesetzt wurde, daß Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 2,0 mg% und 4,0 mg% entstanden. Die Extinktionsmessungen erfolgten 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 520 nm.

Schüttelzeit 2x5 Minuten		
Konzentration	Gemessene Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,049	0,049
	0,049	
	0,049	
1,0 mg%	0,099	0,100
	0,103	
	0,104	
2,0 mg%	0,198	0,200
	0,204	
	0,200	
4,0 mg%	0,390	0,393
	0,390	
	0,400	

Auf eine erneute graphische Darstellung einer Eichkurve für Dikaliumchlorazepat im Serum, ermittelt mit herabgesetzter Schüttelzeit auf 2x5 Minuten, kann hier verzichtet werden. Die Extinktionen nach 2x10 Minuten und 2x5 Minuten Schütteldauer entsprechen einander, die Eich-

kurven nehmen deshalb den gleichen Verlauf.

Aufgrund der Versuchsergebnisse läßt sich sagen, daß zur Herstellung einer Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat im Serum eine Schüttelzeit von 2x5 Minuten genügt. Die Extinktionsmessungen sollten 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm erfolgen. Kurve B in Abb. 18 stellt eine Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat im Serum dar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß - in Anlehnung an die Arbeitsanleitung von FRINGS und COHEN - mit herabgesetzter Schüttelzeit für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat als Zusatz im Serum im Mittel die gleichen Extinktionen gemessen werden wie mit 2x10-minütiger Schüttelung. Die für wässrige Lösungen ermittelte Schüttelzeit von 2x30 Sekunden erwies sich jedoch bei Serum als zu niedrig.

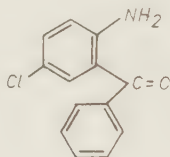
Es wurde für die 3 untersuchten Benzodiazepine jeweils eine neue Schüttelzeit ermittelt. Um die Ergebnisse, die mit 2x10 Minuten Schütteln erreicht wurden, zu bekommen, genügt zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum eine Schütteldauer von 2x1 Minute, von Oxazepam im Serum 2x2 Minuten und von Dikaliumchlorazepat im Serum 2x5 Minuten. Das führt immerhin zu einer nicht unerheblichen Verkürzung des Arbeitsaufwandes bei Chlordiazepoxid um 18 Minuten, bei Oxazepam um 16 Minuten und bei Dikaliumchlorazepat um 10 Minuten.

IV) Versuche zur Erfassung eines Verlustes von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Extraktion und Hydrolyse.

Im Kapitel "Stoffwechsel" wurde ausführlich über den Abbau von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im menschlichen Körper berichtet. Dabei konnte festgestellt werden, daß sich bei den drei genannten Benzodiazepinen ein gemeinsames Spaltprodukt nach der Hydrolyse bildet: das 2-Amino-5-chlorbenzophenon.

Es hat die Summenformel: $C_{13}H_{10}ClNO$

und folgende Strukturformel:



Die Extinktionen verschiedener Konzentrationen von 2-Amino-5-chlorbenzophenon sollen zur Herstellung einer Eichkurve dienen. Theoretisch müßten so die Eichkurven von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei 100 % Ausbeute sowohl bei Extraktion als auch Hydrolyse aussehen.

1. Extinktionswerte für 2-Amino-5-chlorbenzophenon bei direkter Farbreaktion.

Aus einer 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Stammlösung (50 mg 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Reinsubstanz sind in 50 ml Äthanol gelöst) pipetiert man in Reagenzgläser 0,01 ml, 0,02 ml, 0,03 ml, 0,04 ml, 0,05 ml und 0,06 ml direkt ein. Diese Mengen wären in 2 ml enthalten, würde man Arbeitsstandards in Konzentrationen von 0,5 mg%, 1,0 mg%, 1,5 mg%, 2,0 mg%,

2,5 mg% und 3,0 mg% aus einer 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Stammlösung herstellen.

Da Extraktion und Hydrolyse entfallen, ergänzt man jetzt mit 6n HCl auf 3 ml. Nach dem Schütteln werden 2 ml entnommen, dem Arbeitsgang von FRINGS und COHEN folgend, 2 ml H₂O und 0,5 ml NaNO₂ 0,1 % hinzugegeben, gemischt und 5 Minuten stehengelassen. Anschließend kommen 0,5 ml Ammonium-Sulfamidat 0,5 % - wieder mischen - und 1,0 ml Kupplungsreagens hinzu. Nach 35 Minuten erfolgt die photometrische Messung bei 550 nm.

Die Ergebnisse aus 3 Bestimmungen pro Konzentration finden sich in Tab. 24.

Tabelle 24

Extinktionswerte bei direkter Farbreaktion von 2-Amino-5-chlorbenzophenon mit 6 verschiedenen Konzentrationen aus einer 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Stammlösung (50 mg 2-Amino-5-chlorbenzophenon in 50 ml Äthanol), gemessen nach 35 Minuten bei 550 nm.

Konzentration	Gemessene Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,197 0,197 0,213	0,202
1,0 mg%	0,385 0,391 0,399	0,392
1,5 mg%	0,570 0,580 0,588	0,579
2,0 mg%	0,775 0,779 0,782	0,779
2,5 mg%	0,904 0,925 0,930	0,920
3,0 mg%	1,058 1,060 1,070	1,063

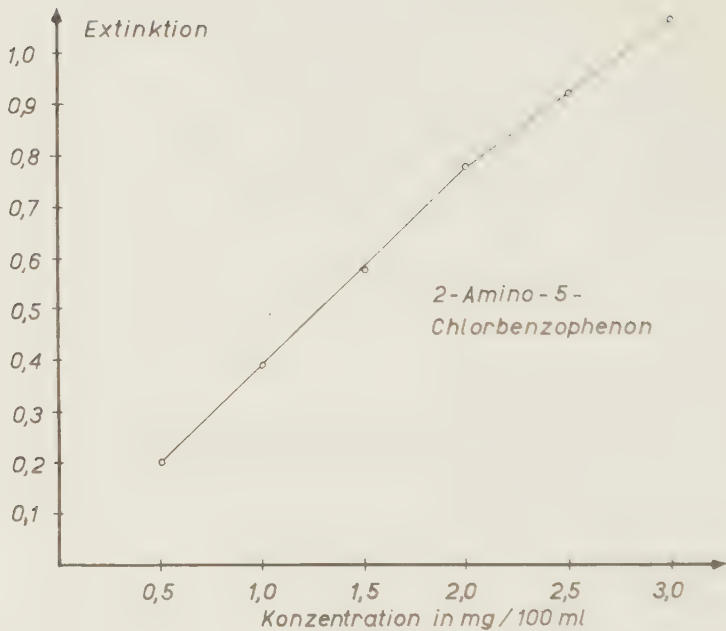


Abb. 20

Eichkurve für 2-Amino-5-chlorbenzophenon, ermittelt durch direkte Farbreaktion.

Die in Abb. 20 dargestellte Eichkurve weist ab 2,0 mg% einen Knick auf. Der Grund hierfür könnte in der nicht mehr exakten Meßbarkeit der sehr intensiven violetten Färbung liegen. Die Kurve ist von 0,5 mg% bis 2,0 mg% linear und kann in diesem Bereich zur Berechnung des Verlustes von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung und im Serum verwendet werden.

2. Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat, ermittelt ohne Chloroformextraktion.

Zur Berechnung des Verlustes durch Extraktion und Hydrolyse sind neben den Extinktionswerten von 2-Amino-5-chlorbenzophenon bei direkter Farbreaktion auch die Extinktionswerte von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat ohne Chloroformextraktion erforderlich.

Bei jeder Versuchsreihe wurde entsprechend S. 16 bei Schritt 3. b der Arbeitsanleitung begonnen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Aus der jeweiligen Stammlösung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat wurden in 50 ml Erlenmeyer-Kolben direkt unterschiedliche Volumina - den Konzentrationen der Arbeitsstandards entsprechend - pipetiert.

Entnimmt man z.B. einem Chlordiazepoxid-Arbeitsstandard in der Konzentration von 2,0 mg% 2 ml für den Meßansatz, befinden sich darin 0,04 mg gelöstes Chlordiazepoxid.

0,04 mg Chlordiazepoxid sind aber in 0,04 ml Chlordiazepoxid-Stammlösung enthalten. Pipetiert man also direkt 0,04 ml aus der Stammlösung, entspricht das der Menge, die in 2 ml eines Arbeitsstandards von 2,0 mg% wären.

0,01 ml $\hat{=}$ 0,5 mg%, 0,02 ml $\hat{=}$ 1,0 mg%, 0,03 ml $\hat{=}$ 1,5 mg% usw.

Zu dieser direkt pipetierten Menge kamen 10 ml Chloroform und 3 ml 6n HCl. Das Gemisch wurde 10 Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die restlichen Schritte liefen nach der Arbeitsanleitung von FRINGS und COHEN ab (S. 16). Die Extinktionsmessungen erfolgten nach der optimalen Wartezeit von 35 Minuten bei 550 nm.

Die gemessenen Extinktionswerte mit Mittelwerten von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat finden sich in den Tabellen 25, 26 und 27.

Tabelle 25

Ohne Chloroformextraktion gemessene Extinktionswerte für unterschiedliche Chlordiazepoxid-Konzentrationen. Schüttelzeit 1x10 Minuten, Extinktionsmessung nach 35' bei 550 nm.

Konzentration	Aus der Stamm- lösung	Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,01 ml	0,080 0,082 0,083	0,082
1,0 mg%	0,02 ml	0,160 0,163 0,164	0,162
2,0 mg%	0,04 ml	0,317 0,324 0,329	0,323
4,0 mg%	0,08 ml	0,630 0,640 0,651	0,640 ⁺⁾

+) Messung erfolgte nach 45 Minuten

Tabelle 26

Ohne Chloroformextraktion gemessene Extinktionswerte für unterschiedliche Oxazepam-Konzentrationen. Schüttelzeit 1x10 Minuten, Extinktionsmessung nach 35' bei 550 nm.

Konzentration	Aus der Stamm- lösung	Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,01 ml	0,110 0,115 0,115	0,113
1,0 mg%	0,02 ml	0,220 0,226 0,230	0,225
1,5 mg%	0,03 ml	0,330 0,332 0,335	0,332
2,0 mg%	0,04 ml	0,441 0,441 0,451	0,444

Tabelle 27

Ohne Chloroformextraktion gemessene Extinktionswerte für unterschiedliche Dikaliumchlorazepat-Konzentrationen. Schüttelzeit 1x10 Minuten, Extinktionsmessung nach 35 Minuten bei 550 nm.

Konzentration	Aus der Stammlösung	Extinktion nach 35'	Mittelwert
0,5 mg%	0,01 ml	0,120 0,120 0,121	0,120
1,0 mg%	0,02 ml	0,227 0,230 0,233	0,230
1,5 mg%	0,03 ml	0,311 0,325 0,326	0,321
2,0 mg%	0,04 ml	0,423 0,425 0,431	0,426
2,5 mg%	0,05 ml	0,518 0,520 0,526	0,521
3,0 mg%	0,06 ml	0,610 0,620 0,622	0,617 ⁺⁾

⁺⁾ Messung erfolgte nach 40 Minuten

Die Mittelwerte aus je 3 Bestimmungen pro Konzentration aus Tabelle 25, 26 und 27 ergeben, eingetragen in ein Diagramm, die Extinktionskurven in Abb. 21.

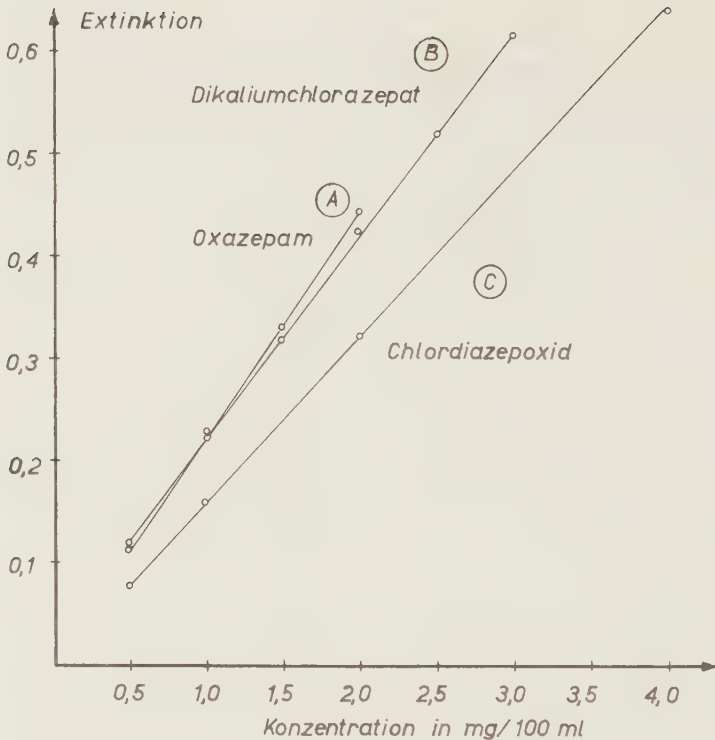


Abb. 21

Extinktionsmittelwerte verschiedener Oxazepam-Konzentrationen (Kurve A), Dikaliumchlorazepat-Konzentrationen (Kurve B) und Chlordiazepoxid-Konzentrationen (Kurve C), ermittelt ohne Chloroformextraktion.

Bei den in Abb. 21 wiedergegebenen Kurven ist zu beachten, daß bei jeweils gleicher Konzentration nicht äquimolare Mengen der einzelnen Benzodiazepine vorliegen.

Zur Berechnung des Verlustes durch Extraktion und Hydrolyse ist die molare Konzentration der eingesetzten Lösungen zugrunde zu legen.

3. Berechnung der äquivalenten Konzentrationen von
2-Amino-5-chlorbenzophenon, Chlordiazepoxid,
Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

Das 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Molekül ist kleiner als das Chlordiazepoxid-, Oxazepam- und Dikaliumchlorazepat-Molekül (siehe Abb. 1). Im Verlaufe der Hydrolyse wird ein Teil des Chlordiazepoxid-, Oxazepam- oder Dikaliumchlorazepat-Moleküls abgespalten und es bleibt nur das 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Molekül übrig.

Dieser Verlust muß entweder bei der Einwaage oder wie hier bei der Berechnung berücksichtigt werden. Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von 2-Amino-5-chlorbenzophenon, Oxazepam, Chlordiazepoxid und Dikaliumchlorazepat (Tab. 28) und der Voraussetzung, daß z.B. Chlordiazepoxid zu 100 % extrahiert und hydrolysiert würde, erhielte man beim Nachweis von Chlordiazepoxid nach FRINGS und COHEN mit einem Arbeitsstandard in der Konzentration von 1,0 mg% 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens die gleiche Extinktion wie bei der direkten Farbreaktion mit einem 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Arbeitsstandard in der Konzentration von 0,77 mg% (siehe Tab. 29).

Tabelle 28

Molekulargewichte von 2-Amino-5-chlorbenzophenon, Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

Molekül	Summenformel	Molekulargewicht
2-Amino-5-chlorbenzophenon	$C_{13}H_{10}ClNO$	231,7
Oxazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	286,4
Chlordiazepoxid	$C_{16}H_{14}ClN_3O$	299,8
Dikaliumchlorazepat	$C_{16}H_{13}ClN_2O_4$	332,7

In Tabelle 29 sind 6 verschiedene - mit Hilfe der jeweiligen Molekulargewichte berechnete - äquivalente Konzentrationen von 2-Amino-5-chlorbenzophenon, Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat zusammengefaßt.

Tabelle 29

Äquivalente Konzentrationen von 2-Amino-5-chlorbenzophenon, Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

Chlordiazepoxid	2-Amino-5-chlorbenzophenon	Oxazepam	2-Amino-5-chlorbenzophenon
0,5 mg%	0,39 mg%	0,5 mg%	0,40 mg%
1,0 mg%	0,77 mg%	1,0 mg%	0,81 mg%
1,5 mg%	1,16 mg%	1,5 mg%	1,21 mg%
2,0 mg%	1,55 mg%	2,0 mg%	1,62 mg%
2,5 mg%	1,93 mg%	2,5 mg%	2,02 mg%
3,0 mg%	2,32 mg%	3,0 mg%	2,43 mg%
Dikaliumchlorazepat		2-Amino-5-chlorbenzophenon	
0,5 mg%		0,35 mg%	
1,0 mg%		0,70 mg%	
1,5 mg%		1,04 mg%	
2,0 mg%		1,39 mg%	
2,5 mg%		1,74 mg%	
3,0 mg%		2,09 mg%	

4. Berechnung der Verluste durch Hydrolyse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

Führt man die Bestimmung der Benzodiazepine unter Fortlassung der Chloroformextraktion durch - wie dies auf Seite 73 beschrieben wurde - so ist die Abweichung von dem mit einer äquivalenten Menge an 2-Amino-5-chlorbenzophenon erhaltenen Extinktion auf Verluste bei der Hydrolyse zurückzuführen.

Die Berechnung des Verlustes durch Hydrolyse soll am Beispiel eines Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in der Konzentration von 1,0 mg% gezeigt werden:

1,0 mg% Chlordiazepoxid sollte bei vollständiger Hydrolyse 0,77 mg% 2-Amino-5-chlorbenzophenon ergeben (Tab. 29).

Eine 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Lösung in einer Konzentration von 0,77 mg% müßte - der Eichkurve in Abb. 20 entsprechend - eine Extinktion von 0,302 aufweisen.

Tatsächlich erhielten wir bei Einsatz von 1,0 mg% Chlordiazepoxid bei direkter Hydrolyse nur eine Extinktion von 0,162 (s. Tab. 25). Dies entspricht 0,41 mg% 2-Amino-5-chlorbenzophenon.

Bei einer Chlordiazepoxid-Konzentration von 1,0 mg% tritt somit ein Verlust an Chlordiazepoxid durch Hydrolyse von 46,3 % auf.

Auf diese Weise errechnen sich alle in Tab. 30, 31 und 32 wiedergegebenen Verluststraten von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

Tabelle 30

Verlust an Chlordiazepoxid durch Hydrolyse (Bestimmung ohne Chloroformextraktion).

Chlordiazepoxid-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	47,9 %
1,0 mg%	46,3 %
2,0 mg%	46,5 %

Aus Tabelle 30 ist ersichtlich, daß im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% der Verlust an Chlordiazepoxid bei der Hydrolyse durchschnittlich 47,0 % beträgt.

Tabelle 31

Verlust an Oxazepam durch Hydrolyse (Bestimmung ohne Chloroformextraktion).

Oxazepam-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	30,0 %
1,0 mg%	29,1 %
1,5 mg%	28,9 %
2,0 mg%	29,6 %

Aus Tabelle 31 ist ersichtlich, daß im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% der Verlust an Oxazepam bei der Hydrolyse durchschnittlich 29,5 % beträgt.

Tabelle 32

Verlust an Dikaliumchlorazepat durch Hydrolyse (Bestimmung ohne Chloroformextraktion).

Dikaliumchlorazepat-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	14,9 %
1,0 mg%	16,2 %
1,5 mg%	20,0 %
2,0 mg%	21,3 %

Aus Tabelle 32 ist ersichtlich, daß mit steigender Konzentration von 0,5 mg% bis 2,0 mg% der Verlust an Dikaliumchlorazepat bei der Hydrolyse zunimmt. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß die ohne Chloroformextraktion gemessenen Extinktionswerte für unterschiedliche Dikaliumchlorazepat-Konzentrationen nicht dem Beer'schen Gesetz folgen, also bei doppelter Konzentration nicht die doppelte Extinktion gemessen wurde (siehe Tabelle 27):

Im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% beträgt der Verlust an Dikaliumchlorazepat bei der Hydrolyse durchschnittlich 18,0 %.

Will man den Verlust von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat durch Hydrolyse graphisch darstellen, so kann man das auf folgende Weise tun:

Die Extinktionswerte für 2-Amino-5-chlorbenzophenon, ermittelt durch direkte Farbreaktion, entsprechen 100 % (Tab. 24). 0,5 mg% 2-Amino-5-chlorbenzophenon z.B. entsprechen 0,65 mg% Chlordiazepoxid, 0,62 mg% Oxazepam und 0,72 mg% Dikaliumchlorazepat (s. Seite 76).

Bei 100 % Hydrolyse müßten bei diesen Konzentrationen die gleichen Extinktionen gemessen werden wie bei einer 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Konzentration von 0,5 mg%. Die gemessenen Werte zeigen jedoch, daß dies nicht der Fall ist (s. Tab. 24, 25, 26 und 27).

Wie aus Abb. 21 - Extinktionswerte von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat, ermittelt ohne Chloroformextraktion - ersichtlich, ist bei einer Chlordiazepoxid-Konzentration von 0,65 mg% eine Extinktion von 0,1 zu erwarten, bei einer Oxazepam-Konzentration von 0,62 mg% eine Extinktion von 0,14 und bei einer Dikaliumchlorazepat-Konzentration von 0,72 mg% eine Extinktion von 0,17.

Überträgt man die Extinktionen der äquimolaren Mengen der einzelnen Benzodiazepine in ein Diagramm, erhält man die in Abb. 22 dargestellten Kurven, die den durchschnittlichen

Verlust an Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Hydrolyse veranschaulichen.

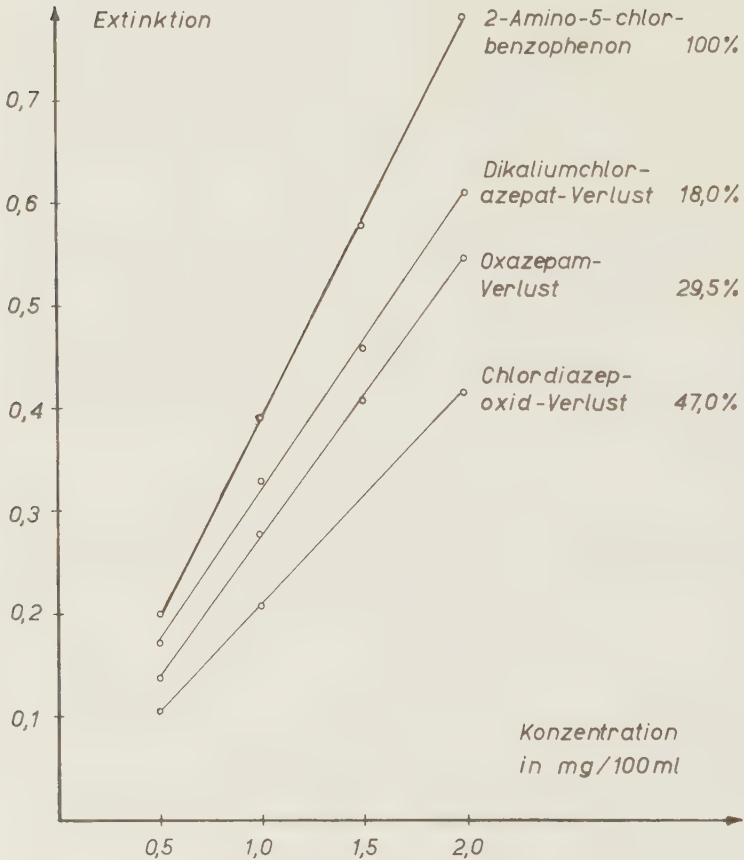


Abb. 22

Durchschnittlicher Verlust an Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Hydrolyse.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß bei der Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Hydrolyse zum Teil erhebliche Verluste auftreten. Sie betragen im Durchschnitt bei Chlordiazepoxid 47,0 %, bei Oxazepam 29,5 % und bei Dikaliumchlorazepat 18,0 %.

5. Berechnung der Verluste durch Extraktion und Hydrolyse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung.

Führt man die Bestimmung der Benzodiazepine in wässriger Lösung durch - Schüttelzeit 2x10 Minuten und Extinktionsmessung nach 35 Minuten (siehe Seite 21) - so ist die Abweichung von dem mit einer äquivalenten Menge an 2-Amino-5-chlorbenzophenon erhaltenen Extinktion auf Verluste bei der Extraktion und Hydrolyse zurückzuführen.

Die Berechnung des Verlustes durch Extraktion und Hydrolyse soll am Beispiel eines Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in der Konzentration von 1,0 mg% gezeigt werden:

1,0 mg Chlordiazepoxid sollte bei vollständiger Hydrolyse 0,77 mg 2-Amino-5-chlorbenzophenon ergeben (vergleiche Tab. 29). Eine 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Lösung müßte - der Eichkurve in Abb. 20 entsprechend - eine Extinktion von 0,302 aufweisen.

Tatsächlich erhielten wir bei Einsatz von 1,0 mg% Chlordiazepoxid in wässriger Lösung bei vollem Arbeitsgang nur eine Extinktion von 0,100 (siehe Tab. 5). Dies entspricht 0,26 mg% 2-Amino-5-chlorbenzophenon.

Bei einer Chlordiazepoxid-Konzentration von 1,0 mg% in wässriger Lösung tritt somit ein Verlust an Chlordiazepoxid durch Extraktion und Hydrolyse von 66,9 % auf.

Unter Berücksichtigung der Extinktionswerte von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung (Tab. 5, 6 und 7) errechnen sich auf diese Weise alle in den folgenden Tabellen 33, 34 und 35 wiedergegebenen Verlust-

raten von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

Tabelle 33

Verlust an Chlordiazepoxid in wässriger Lösung bei der Extraktion und Hydrolyse.

Chlordiazepoxid-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	68,2 %
1,0 mg%	66,9 %
2,0 mg%	66,9 %

Bei der Extraktion und Hydrolyse von Chlordiazepoxid in wässriger Lösung beträgt der Verlust im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% ca. 67,5 %.

Tabelle 34

Verlust an Oxazepam in wässriger Lösung bei der Extraktion und Hydrolyse.

Oxazepam-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	38,7 %
1,0 mg%	37,0 %
2,0 mg%	36,8 %

Bei der Extraktion und Hydrolyse von Oxazepam in wässriger Lösung beträgt der Verlust im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% ca. 37,5 %.

Tabelle 35

Verlust an Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung bei der Extraktion und Hydrolyse.

Dikaliumchlorazepat-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	-
1,0 mg%	-
2,0 mg%	91,3 %

Da Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung erst ab ca. 2,0 mg% meßbare Extinktionen liefert (Tabelle 7), wurde nur für diese Konzentration die Verlustrate ermittelt. Sie liegt mit 91,5 %, wie Tabelle 35 zeigt, extrem hoch.

Will man den Verlust an Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei Extraktion und Hydrolyse graphisch darstellen, kann man das - wie auf Seite 79 bereits beschrieben - auf folgende Weise tun:

Die Extinktionswerte für 2-Amino-5-chlorbenzophenon, ermittelt durch direkte Farbreaktion, entsprechen 100 % (siehe Tab. 24). 0,5 mg% 2-Amino-5-chlorbenzophenon z.B. entsprechen 0,65 mg% Chlordiazepoxid, 0,62 mg% Oxazepam und 0,72 mg% Dikaliumchlorazepat (siehe Seite 76).

Bei 100 % Extraktion und Hydrolyse müßten bei diesen Konzentrationen die gleichen Extinktionen gemessen werden wie bei einer 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Konzentration von 0,5 mg%. Die gemessenen Werte zeigen jedoch, daß dies nicht der Fall ist (siehe Tabelle 5, 6, 7 und 24).

Wie aus den Abb. 6, 7 und 8 - Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung - ersichtlich, ist bei einer Chlordiazepoxid-Konzentration von 0,65 mg% eine Extinktion von 0,065 zu erwarten und bei einer Oxazepam-Konzentration von 0,62 mg% eine Extinktion von 0,12.

Überträgt man also die Extinktionen der äquimolaren Mengen der einzelnen Benzodiazepine in wässriger Lösung in ein Diagramm, erhält man die in Abb. 23 dargestellten Kurven, die den durchschnittlichen Verlust an Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Extraktion und Hydrolyse veranschaulichen.

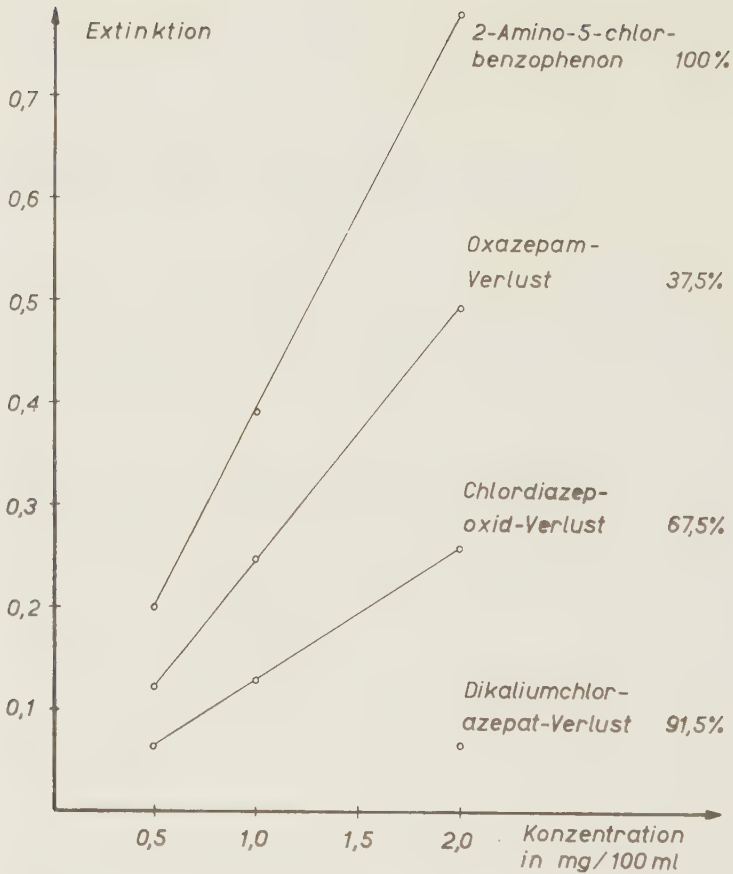


Abb. 23

Durchschnittlicher Verlust an Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei Extraktion und Hydrolyse aus wässriger Lösung. Zugrunde liegen Schüttelzeiten von 2x10 Minuten und Extinktionsmessungen 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Extraktion und Hydrolyse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung sehr hohe Verluste auftreten. Sie betragen durchschnittlich für Chlordiazepoxid 67,5 %, für Oxazepam 37,5 % und für Dikaliumchlorazepat 91,5 %.

Subtrahiert man nun die durchschnittlichen Verlustraten von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat, ermittelt durch unvollständige Hydrolyse, von den Verlustraten, ermittelt durch unvollständige Extraktion und Hydrolyse aus wässriger Lösung, so erhält man die durchschnittlichen Verlustraten, die allein auf unvollständige Extraktion der genannten Benzodiazepine in wässriger Lösung zurückgeführt werden können.

Eine Übersicht vermittelt Tabelle 36

Tabelle 36

Verluste durch unvollständige Extraktion und Hydrolyse bei der Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung.

	Chlordiazepoxid	Oxazepam	Dikaliumchlorazepat
Durchschnittlicher Verlust durch unvollständige Extraktion aus wässriger Lösung	20,5 %	8,0 %	73,5 %
Durchschnittlicher Verlust durch unvollständige Hydrolyse (Tab. 30, 31 u. 32)	47,0 %	29,5 %	18,0 %
Durchschnittlicher Verlust durch unvollständige Extraktion und Hydrolyse aus wässriger Lösung (Tab. 33, 34 u. 35)	67,5 %	37,5 %	91,5 %

Die Tabelle 36 zeigt, daß die Verluste durch Extraktion aus wässriger Lösung bei den 3 Benzodiazepinen recht unterschiedlich sind. Während man bei Oxazepam nur etwa 8,0 % verliert, sind es bei Chlordiazepoxid immerhin schon 20,5 % und bei Dikaliumchlorazepat sogar 73,5 %.

Ein Vergleich zeigt weiter, daß bei der anschließenden Hydrolyse Dikaliumchlorazepat jedoch mit 18 % die geringsten Verluste hat, während Oxazepam nochmals 29,5 % und Chlordiazepoxid 47,0 % durch Hydrolyse verlieren.

6. Berechnung der Verluste durch Extraktion und Hydrolyse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum.

Führt man die Bestimmung der Benzodiazepine im Serum durch - mit herabgesetzter Schüttelzeit für Chlordiazepoxid mit 2x1 Minute, für Oxazepam mit 2x2 Minuten und für Dikaliumchlorazepat mit 2x5 Minuten und Extinktionsmessung nach 35 Minuten - so ist die Abweichung von dem mit einer äquivalenten Menge an 2-Amino-5-chlorbenzophenon erhaltenen Extinktion auf Verluste bei der Extraktion und Hydrolyse zurückzuführen.

Die Berechnung des Verlustes durch Extraktion und Hydrolyse soll am Beispiel eines Chlordiazepoxid-Arbeitsstandards in der Konzentration von 1,0 mg% gezeigt werden:

1,0 mg Chlordiazepoxid sollte bei vollständiger Hydrolyse 0,77 mg 2-Amino-5-chlorbenzophenon ergeben (vergleiche Tab. 29). Eine 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Lösung müßte - der Eichkurve in Abb. 20 entsprechend - eine Extinktion von 0,302 aufweisen.

Tatsächlich erhielten wir bei Einsatz von 1,0 mg% Chlordiazepoxid im Serum bei vollem Arbeitsgang nur eine Extinktion von 0,098 (siehe Tab. 17). Dies entspricht 0,25 mg% 2-Amino-5-chlorbenzophenon.

Bei einer Chlordiazepoxid-Konzentration im Serum von 1,0 mg% tritt somit ein Verlust an Chlordiazepoxid durch Extraktion und Hydrolyse von 67,5 % auf.

Unter Berücksichtigung der Extinktionswerte von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum (siehe Tab. 17, 20 und 23) errechnen sich auf diese Weise alle in den folgenden Tabellen 37, 38 und 39 wiedergegebenen Verlusten von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat.

Tabelle 37

Verlust an Chlordiazepoxid im Serum bei Extraktion und Hydrolyse.

Chlordiazepoxid-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	68,9 %
1,0 mg%	67,5 %
2,0 mg%	66,5 %

Bei der Extraktion und Hydrolyse von Chlordiazepoxid im Serum beträgt der Verlust im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% ca. 67,5 %.

Tabelle 38

Verlust an Oxazepam im Serum bei Extraktion und Hydrolyse.

Oxazepam-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	38,7 %
1,0 mg%	37,0 %
2,0 mg%	37,1 %

Bei der Extraktion und Hydrolyse von Oxazepam im Serum beträgt der Verlust im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% ca. 37,5 %.

Tabelle 39

Verlust an Dikaliumchlorazepat im Serum bei der Extraktion und Hydrolyse.

Dikaliumchlorazepat-Konzentration	Verlust in %
0,5 mg%	65,4 %
1,0 mg%	62,8 %
2,0 mg%	62,9 %

Bei der Extraktion und Hydrolyse von Dikaliumchlorazepat im Serum beträgt der Verlust im Bereich von 0,5 mg% bis 2,0 mg% ca. 63,5 %.

Die graphische Darstellung des Verlustes von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum bei der Extraktion und Hydrolyse geschieht nach dem gleichen Schema wie bereits auf den Seiten 79 und 83 beschrieben:

Die Extinktionswerte für 2-Amino-5-chlorbenzophenon, ermittelt durch direkte Farbreaktion, entsprechen 100 % (siehe Tab. 24). 0,5 mg% 2-Amino-5-chlorbenzophenon z.B. entsprechen 0,65 mg% Chlordiazepoxid, 0,62 mg% Oxazepam und 0,72 mg% Dikaliumchlorazepat (siehe Seite 75).

Bei 100 % Extraktion und Hydrolyse müßten bei diesen Konzentrationen die gleichen Extinktionen gemessen werden wie bei einer 2-Amino-5-chlorbenzophenon-Konzentration von 0,5 mg%. Die gemessenen Werte zeigen jedoch, daß dies nicht der Fall ist (siehe Tabelle 17, 20, 23 und 24).

Wie aus den Abb. 15, 16 und 18 - Extinktionswerte für Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum - ersichtlich, ist bei einer Chlordiazepoxid-Konzentration von 0,65 mg% eine Extinktion von 0,065 zu erwarten, bei einer Oxazepam-Konzentration von 0,62 mg% eine Extinktion von 0,12 und bei einer Dikaliumchlorazepat-Konzentration von 0,72 eine Extinktion von 0,07.

Überträgt man die Extinktionen der äquimolaren Mengen der einzelnen Benzodiazepine im Serum in ein Diagramm, erhält man

die in Abb. 24 dargestellten Kurven, die den durchschnittlichen Verlust an Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Extraktion und Hydrolyse veranschaulichen.

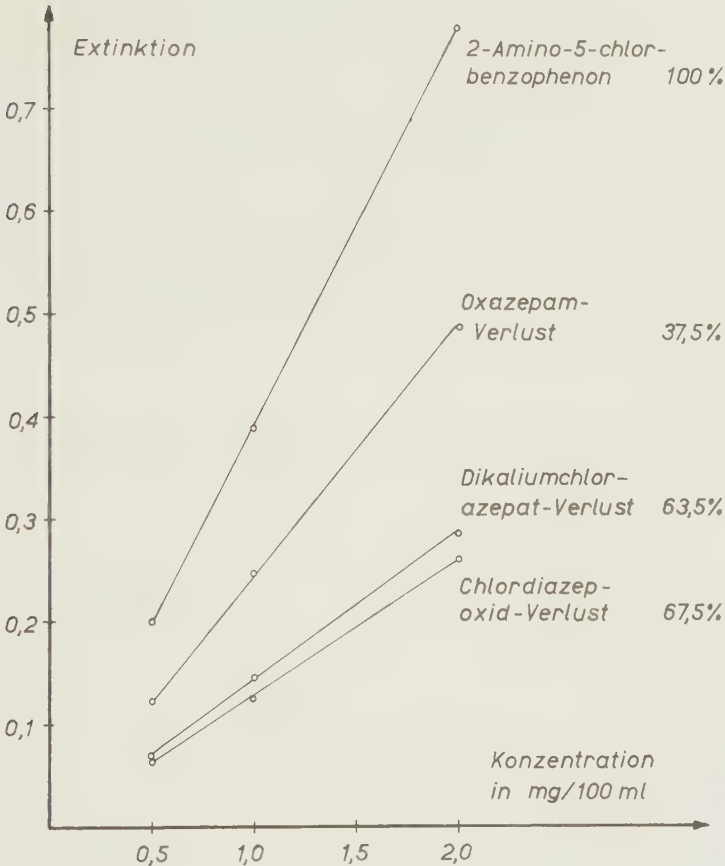


Abb. 24

Durchschnittlicher Verlust der 3 Benzodiazepine im Serum bei Extraktion und Hydrolyse. Schüttelzeit von Chlordiazepoxid 2x1 Minute, von Oxazepam 2x2 Minuten und von Dikaliumchlorazepat 2x5 Minuten. Extinktionsmessung nach 35 Minuten.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei der Extraktion und Hydrolyse der Benzodiazepine im Serum für Chlordiazepoxid und Oxazepam gleich hohe Verluste auftreten wie in wässriger Lösung (siehe Tab. 36). Bei Dikaliumchlorazepat jedoch liegen die Verluste niedriger, hervorgerufen durch die bessere Extrahierbarkeit im Serum als im Wasser (siehe Seite 63).

Subtrahiert man nun die durchschnittlichen Verlustraten von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat, ermittelt durch unvollständige Hydrolyse, von den Verlustraten, ermittelt durch unvollständige Extraktion und Hydrolyse aus Serum, so erhält man die durchschnittlichen Verlustraten, die allein auf unvollständige Extraktion der genannten Benzodiazepine im Serum zurückgeführt werden können. Eine Übersicht vermittelt Tabelle 40.

Tabelle 40

Verluste durch unvollständige Extraktion und Hydrolyse bei der Bestimmung von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat im Serum.

	Chlordiazepoxid	Oxazepam	Dikaliumchlorazepat
Durchschnittlicher Verlust durch unvollständige Extraktion aus dem Serum	20,5 %	8,0 %	45,5 %
Durchschnittlicher Verlust durch unvollständige Hydrolyse (Tab. 30, 31 u. 32)	47,0 %	29,5 %	18,0 %
Durchschnittlicher Verlust durch unvollständige Extraktion und Hydrolyse aus Serum (Tab. 37, 38, 39)	67,5 %	37,5 %	63,5 %

Wie aus Tabelle 40 zu entnehmen ist, weist Oxazepam im Serum durch unvollständige Extraktion mit 8,0 % den geringsten Verlust unter den 3 Benzodiazepinen auf. Trotz Verlustes von 29,5 % bei der Hydrolyse bleibt der Gesamtverlust durch Extraktion und Hydrolyse mit 37,5 % relativ gering.

Ungenügend - wenngleich besser als aus wässriger Lösung - läßt sich Dikaliumchlorazepat aus dem Serum extrahieren. Die Verlustrate beträgt 45,5 %. Weitere 18 % gehen bei der Hydrolyse verloren, woraus der Gesamtverlust von 63,5 % resultiert.

Etwas höher noch liegt der Verlust bei der Bestimmung von Chlordiazepoxid aus dem Serum mit 67,5 %, worauf durch unvollständige Extraktion ein Verlust von 20,5 % und durch unvollständige Hydrolyse ein Verlust von 47,0 % entfällt.

(F) Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum und ihre Anwendbarkeit für Oxazepam und Dikaliumchlorazepat untersucht. Diese Methode beschrieben FRINGS und COHEN erstmals 1971 für Chlordiazepoxid als Modifikation einer colorimetrischen Methode von RANDALL. GERMANO führte 1974 eine größere Anzahl Versuche mit Chlordiazepoxid nach der Arbeitsanleitung von FRINGS und COHEN sowohl in vitro als auch in vivo durch.

In eigenen Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß die sowohl von FRINGS und COHEN als auch von GERMANO gemachten Angaben bezüglich Schnelligkeit, Genauigkeit, Empfindlichkeit und geringem Aufwand nahezu erfüllt wurden. Das trifft neben Chlordiazepoxid auch für die untersuchten Benzodiazepine Oxazepam und Dikaliumchlorazepat zu. Diese Aussage stützt sich auf insgesamt 332 durchgeführte Bestimmungen, von denen auf Chlordiazepoxid 143, auf Oxazepam 96 und auf Dikaliumchlorazepat 93 entfielen.

Im Unterschied zu den genannten Autoren erwiesen sich als optimaler Meßzeitpunkt nach Zugabe des Kupplungsreagens nicht 15 Minuten sondern 35 Minuten, mit Ausnahme von Extinktionen über 0,500. Hier benötigte der violette Azofarbstoff sogar 40 bzw. 45 Minuten bis zur Stabilisierung und blieb, nach verschiedenen Probemessungen, mindestens 2 Stunden (FRINGS und COHEN geben 10 Minuten an) beständig. Diese Tatsache gewinnt Bedeutung, wenn viele Bestimmungen vorzunehmen sind.

Die Ergebnisse der Versuche mit Chlordiazepoxid und Oxazepam in wässriger Lösung unterschieden sich von denen im Serum nur minimal. Während mit Schüttelzeiten von 2x10 Minuten und Extinktionsmessung nach 35 Minuten praktisch die gleiche Extinktionen gemessen wurden, waren bei verkürzter Schüttelzeit für wässrige Lösungen und für Serum verschiedene Schüttelzeiten erforderlich.

Dikaliumchlorazepat hingegen ließ sich aus wässriger Lösung sehr schlecht extrahieren, so daß eine Eichkurve nicht erstellt wurde. Aus dem Serum jedoch konnte Dikaliumchlorazepat mit befriedigendem Ergebnis extrahiert und somit eine Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Dikaliumchlorazepat hergestellt werden.

Bei den Versuchen mit Serum zur Senkung der Schüttelzeiten wurden im Vergleich mit Extinktionswerten, die nach 2x10 Minuten Schütteldauer 35 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens bei 550 nm gemessen wurden, folgende Schüttelzeiten für ausreichend befunden:

- a) Chlordiazepoxid : 2x1 Minute
- b) Oxazepam : 2x2 Minuten
- c) Dikaliumchlorazepat : 2x5 Minuten

Ist allerdings das aus dem Serum nachzuweisende Benzodiazepin unbekannt, und man möchte einen gesicherten Nachweis mit maximalen Extinktionswerten, sollte mit Schüttelzeiten von 2x5 Minuten gearbeitet werden.

Für Chlordiazepoxid und Dikaliumchlorazepat kann dabei die gleiche Eichkurve verwendet werden, bedingt durch im Mittel gleiche Extinktion bei entsprechender Konzentration. Oxazepam weist ziemlich genau die doppelte Extinktion wie Chlordiazepoxid und Dikaliumchlorazepat bei gleicher Konzentration auf und besitzt demnach eine eigene Eichkurve.

Das Ziel, das Verfahren durch Verkürzung der Schüttelzeiten zu beschleunigen, wurde nur teilweise erreicht. Da FRINGS und COHEN sowie GERMANO bereits 15 Minuten nach Zugabe des Kupplungsreagens ihre Messungen vornahmen und in eigenen Versuchen erst nach 35 Minuten gemessen wurde, bleibt die Gesamtzeit für jeden Arbeitsgang, einschließlich Extinktionsmessung, gleich. Lediglich die reine Arbeitszeit konnte für Chlordiazepoxid um 18 Minuten, für Oxazepam um 16 Minuten und für Dikaliumchlorazepat um 10 Minuten verkürzt werden.

Der zeitliche Aufwand ist für jeden Arbeitsgang mit vier Bestimmungen, einschließlich des Leerwertes, bei 2x1 Minute Schüttelzeit mit ca. 90 Minuten anzusetzen. Er darf als gering, gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren, angesehen werden. KOECHLIN und D'ARCONTE z.B. benötigen für ihre fluorometrische Bestimmungsmethode 6-7 Stunden.

Ogleich sich die Extinktionsergebnisse von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei der Bestimmung aus dem Serum gut reproduzieren lassen, treten bei der Extraktion und Hydrolyse zum Teil erhebliche Verluste auf.

Als Berechnungsgrundlage für die Verluste dienen die in eigenen Versuchen gemessenen Extinktionen verschiedener Konzentrationen von 2-Amino-5-chlorbenzophenon bei direkter Farbreaktion. Theoretisch müßten die Eichkurven von Chlordiazepoxid, Oxazepam und Dikaliumchlorazepat bei 100 % Ausbeute sowohl bei der Extraktion als auch Hydrolyse der Eichkurve von 2-Amino-5-chlorbenzophenon entsprechen.

Am besten ließ sich Oxazepam aus dem Serum extrahieren. 92,0 % gelangten zur Weiterverarbeitung. Bei Chlordiazepoxid waren es noch 79,5 %, während Dikaliumchlorazepat nur noch zu 54,5 % extrahiert werden konnte. Bei der anschließenden Hydrolyse zeigten sich noch einmal unterschiedliche Verluste. Chlordiazepoxid verliert 47,0 %, Oxazepam 29,5 % und Dikaliumchlorazepat 18,0 %.

Daraus resultiert für Chlordiazepoxid ein Gesamtverlust durch Extraktion und Hydrolyse von 67,5 %, für Dikaliumchlorazepat von 63,5 % und für Oxazepam von 37,5 %.

Diese teilweise hohen Verluste lassen jedoch nicht den Schluß zu, daß die Methode untauglich sei. In Übereinstimmung mit den Angaben von FRINGS und COHEN sowie GERMANO erweist sich die Bestimmungsmethode als schnell, genau und gut reproduzierbar. Berücksichtigt man, daß FRINGS und COHEN mit Küvetten von 19 mm Schichlänge - im Gegensatz zu den eigenen Ver-

suchen, wo Küvetten mit 10 mm Schichtlänge benützt wurden - gearbeitet haben, wurde für Chlordiazepoxid als Zusatz im Serum praktisch die gleiche Eichkurve ermittelt.

Im Unterschied zu den in eigenen Versuchen ermittelten Verlust- bzw. Wiederfindungsraten gibt JALTOW an, daß mit Hilfe der von ihm angewandten Methode nach GOLDBAUM (Extraktion mit Chloroform, Spektrophotometrische Messung) Chlordiazepoxid zu 84 % wiedergefunden wurde. Unter den genannten Bedingungen konnte er Oxazepam hingegen nur zu 7 % wiederfinden. Die Extinktionsmessungen erfolgten in beiden Fällen mit einem Spektralphotometer bei 247 nm.

In der Diskussion bewertet er den von ihm beschriebenen Prozeß jedoch als nicht spezifisch im strengen Sinne, da offensichtlich jedes Grundmedikament, daß bei neutralem pH extrahiert werden und in HCl wiedergefunden werden kann, potentiell interferieren könnte. In seinen Versuchen konnte JALTOW jedoch keine Interferenzerscheinungen feststellen. Narkotika und Amphetamine z.B. erreichten keine meßbaren Blutkonzentrationen und müssen im Urin gesucht werden.

Vergleichbare Angaben für Dikaliumchlorazepat in wässriger Lösung oder als Zusatz im Serum konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Die Häufigkeit der eigenen Versuche sowie die in den Versuchsreihen ständig überprüfte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dürften aber als Ausdruck der Verlässlichkeit gewertet werden.

(G) Zusammenfassung

Anhand einer Untersuchungsreihe wird ein von FRINGS und COHEN beschriebenes Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Chlordiazepoxid im Serum geprüft und seine Anwendbarkeit für Oxazepam und Dikaliumchlorazepat untersucht. Es zeigte sich, daß die Methode für alle 3 Benzodiazepine zur quantitativen Bestimmung im Serum geeignet ist.

Durch Reduzierung der Schüttelzeiten ließ sich die Arbeitszeit verkürzen, ohne das die gute Reproduzierbarkeit der Extinktionsergebnisse beeinträchtigt wurde.

Bei der Bestimmung treten jedoch zum Teil erhebliche Verluste auf, die sowohl bei der Extraktion als auch bei der Hydrolyse entstehen, was die Empfindlichkeit der Methode teilweise beeinträchtigt.

Davon unabhängig erweist sich das Verfahren als schnell, zuverlässig und wenig aufwendig, so daß es in fast jedem Laboratorium durchgeführt werden kann.

(H) Literaturverzeichnis

1. BÄUMLER, J., RIPPSTEIN, S.:
Über den Nachweis von Methaminodiazepoxid (Librium)
und seiner Metaboliten.
Helv. Chim. Acta 44, 2208 (1961)
2. BESSERER, K., HENZLER, S., KOHLER, E., MALLACH, H.S.:
Mikrochemische Nachweismethoden von Chlordiazepoxid
und Medazepam zur Prüfung der Pharmakokinetik.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 2003 (1971)
3. CUMMINS, L., SCHERFLING, E.:
Human serum nor-diazepam levels resulting from the
administration of chlorazepate dipotassium.
Cook Country Hosp., North Chicago, III Pers. Mitt. 1969
4. CURRY, S.:
Concentration-effect relationships with major and
minor tranquilizers.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 192 (1974)
5. DE SILVA, A.:
Determination of diazepam (Valium) in blood by gas
liquid chromatography.
Anal. Chem. 36, 2099 (1964)
6. FRINGS, C. S., COHEN, B.S.:
Rapid colorimetric method for the quantitative deter-
mination of librium (chlordiazepoxide hydrochloride)
in serum.
Amer. J. Clin. Pathol. 56, 216 (1971)
7. GOLDBAUM, L.R.:
Analytical determination of barbiturates.
Anal. Chem. 24, 1600 (1952)

8. GERMANO, G.:
Überprüfung einer Schnellmethode zur Bestimmung des
Chlordiazepoxid-Spiegels im menschlichen Serum.
Med. Diss. Erlangen 1974
9. JALTOW, P.:
Ultraviolet spectrometric measurement of chlordiazep-
oxide in plasma.
Clin. Chem. 18, 516 (1972)
10. KAMM, G., KELM, R.:
Quantitativer Nachweis von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hy-
droxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on im Plasma
bei einmaliger und längerer Verabreichung.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1659 (1969)
11. KAZYAK, L., KNOBLOCK, E.C.:
Applikation of gas chromatography to analytical
toxicology.
Anal. Chem. 35, 1448 (1963)
12. KOECHLIN, B.A., SCHWARTZ, M.A.:
The metabolic fate of chlordiazepoxide.
Fed. Proc. 20, 171 (1961)
13. KOECHLIN, B.A., D'ARCONTE, L.:
Determination of chlordiazepoxide (Librium) and of a
metabolite of lactam character in plasma of humans,
dogs and rats by a specific spectrofluorometric micro
method.
Anal. Biochem. 5, 195 (1963)
14. KOECHLIN, B.A., SCHWARTZ, M.A., KROL, G., OBERHANSLI, W.:
The metabolic fate of C¹⁴-labeled chlordiazepoxide in
man, in the dog and in the rat.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 148, 399 (1965)

15. MÜLLER, W., WOLLERT, U.:
Interactions of benzodiazepines with human serum albumin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 301 (1973)
16. MÜLLER, W., WOLLERT, U.:
Characterization of the binding of benzodiazepines to human serum albumin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 280, 229 (1973)
17. PELZER, H., MAAß, D.:
Pharmakokinetik und Metabolismus von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on und dessen Hemisuccinat beim Menschen.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1652 (1969)
18. PRIBILLA, O.:
Chlordiazepoxid, Studien zum Nachweis der Ausscheidung beim Menschen.
Arzneim.-Forsch. 14, 723 (1964)
19. RANDALL, L.O.:
Pharmacology of chlordiazepoxide (Librium).
Dis. Nerv. System 22, 1 (1961)
20. SCHWARTZ, M.A., POSTMA, E.:
Metabolic N-demethylation of chlordiazepoxide.
J. Pharm. Sci. 55, 1358 (1966)
21. SCHWARTZ, M.A., POSTMA, E., GAUT, Z.:
Biological half-life of chlordiazepoxide and its metabolite, demoxepam, in man.
J. Pharm. Sci. 60, 1500 (1971)
22. SKUPIN, G., FRANZKE, H.G.:
Die Stellung von Dikaliumchlorazepat (Tranxillium) in der Therapie psychovegetativer Syndrome.
Med. Klinik, 70, 1279 (1975)

23. SMITH, D., PENNINGTON, G.W., JACKSON, N.:
Identification reactions of chlordiazepoxide (Librium)
and the product of acid hydrolysis 2-amino-5-chlor-
benzophenone.
Arch. int. Pharmacodyn. 145, 147 (1963)
24. SMITH, D., PENNINGTON, G.W.:
The detection and excretion of chlordiazepoxide
(Librium) in human plasma and urine.
Arch. int. Pharmacodyn. 145, 154 (1963)

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes und die Übernahme der Korreferates.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen bei der Abfassung der Arbeit und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat.

L e b e n s l a u f

Name: Karl-Heinz Stelzer
geboren am: 27. August 1945
in: Grumbach Kreis Dresden
Staatsangehörigkeit: deutsch
Glaubensbekenntnis: evangelisch
Name der Eltern: Alfred Stelzer, technisch wissenschaftlicher Angestellter in der Kernforschungsanlage Jülich
Hildegard Stelzer geb. Goy
Schulbildung: 1952-1958 Grundschule in Grumbach
1958-1959 Volksschule in Jülich
1959-1963 Realschule in Jülich
Lehrzeit: 1963-1966 Mechanikerlehre in der Kernforschungsanlage Jülich
Kolleg: 1966-1968 Friedrich-Spee-Kolleg in Neuß
Labor: Ein halbes Jahr freiwilliger Mitarbeiter in einem zahntechnischen Labor in Jülich
Studiengang: Studium der Zahnmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg
SS 1969 bis SS 1974
Prüfungen: Abitur im August 1968
Vorphysikum im Juli 1970
Physikum im März 1972
Zahnmedizinisches Staatsexamen im Dezember 1974
Beruf: Januar 1974 bis März 1976 am Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg Versuche zur Doktorarbeit durchgeführt.
Seit April 1976 in der Praxis von Herrn Dr. O. Bierschenk in Forchheim als Assistenz-Zahnarzt

Erlangen, im Januar 1977

Alfred Karl-Heinz S t e l z e r

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197